

INTERNATIONAL COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

United States Patent and Trademark
Office
(Box PCT)
Crystal Plaza 2
Washington, DC 20231
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year)

30 June 1999 (30.06.99)

International application No.

PCT/EP98/08096

Applicant's or agent's file reference

E 52 P 2 WO

International filing date (day/month/year)

11 December 1998 (11.12.98)

Priority date (day/month/year)

11 December 1997 (11.12.97)

Applicant

VON EICHEL-STREIBER, Christoph et al

1. The designated Office is hereby notified of its election made:



in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

02 June 1999 (02.06.99)



in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was



was not

made before the expiration of 18 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer

A. Karkachi

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

INTERNATIONAL COOPERATION TREATY

PCT

From the INTERNATIONAL BUREAU

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:

KEIL & SCHAAFHAUSEN
Cronstetten Strasse 66
D-60322 Frankfurt am Main
ALLEMAGNE

Date of mailing (day/month/year) 19 March 1999 (19.03.99)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference E 52 P 2 WO	
International application No. PCT/EP98/08096	International filing date (day/month/year) 11 December 1998 (11.12.98)

1. The following indications appeared on record concerning:									
<input type="checkbox"/> the applicant	<input type="checkbox"/> the inventor <input checked="" type="checkbox"/> the agent <input type="checkbox"/> the common representative								
Name and Address KEIL & SCHAAFHAUSEN Eysseneckstrasse 31 D-60322 Frankfurt am Main Germany	<table border="1"> <tr> <td>State of Nationality</td> <td>State of Residence</td> </tr> <tr> <td colspan="2">Telephone No. 069 597 50 56</td> </tr> <tr> <td colspan="2">Facsimile No. 069 597 50 59</td> </tr> <tr> <td colspan="2">Teleprinter No.</td> </tr> </table>	State of Nationality	State of Residence	Telephone No. 069 597 50 56		Facsimile No. 069 597 50 59		Teleprinter No.	
State of Nationality	State of Residence								
Telephone No. 069 597 50 56									
Facsimile No. 069 597 50 59									
Teleprinter No.									
2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:									
<input type="checkbox"/> the person	<input type="checkbox"/> the name <input checked="" type="checkbox"/> the address <input type="checkbox"/> the nationality <input type="checkbox"/> the residence								
Name and Address KEIL & SCHAAFHAUSEN Cronstettenstrasse 66 D-60322 Frankfurt am Main Germany	<table border="1"> <tr> <td>State of Nationality</td> <td>State of Residence</td> </tr> <tr> <td colspan="2">Telephone No. 069 95-96-23</td> </tr> <tr> <td colspan="2">Facsimile No. 069 5 97 50 59</td> </tr> <tr> <td colspan="2">Teleprinter No.</td> </tr> </table>	State of Nationality	State of Residence	Telephone No. 069 95-96-23		Facsimile No. 069 5 97 50 59		Teleprinter No.	
State of Nationality	State of Residence								
Telephone No. 069 95-96-23									
Facsimile No. 069 5 97 50 59									
Teleprinter No.									
3. Further observations, if necessary:									
4. A copy of this notification has been sent to:									
<input checked="" type="checkbox"/> the receiving Office	<input type="checkbox"/> the designated Offices concerned								
<input checked="" type="checkbox"/> the International Searching Authority	<input type="checkbox"/> the elected Offices concerned								
<input type="checkbox"/> the International Preliminary Examining Authority	<input type="checkbox"/> other:								

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Athina Nickitas-Etienne
Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Telephone No.: (41-22) 338.83.38


**BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
COGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISM
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE**

INTERNATIONAL FORM

Prof. Dr. T. Chakraborty

**Institut f. Med. Mikrobiologie
-Infektionsimmunologie-
Frankfurter Str. 107
D-35392 Gießen**

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT
issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR: EGD hly 2481A	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: DSM 11881
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I. above was accompanied by: <input checked="" type="checkbox"/> a scientific description <input checked="" type="checkbox"/> a proposed taxonomic designation (Mark with a cross where applicable).	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I. above, which was received by it on 1997-12-09 (Date of the original deposit).	
IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION	
The microorganism identified under I above was received by this International Depositary Authority on (date of original deposit) and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on (date of receipt of request for conversion).	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Address: Muschenberg Weg 1a D-38124 Braunschweig	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s):  DSMZ 1997-12-16

¹ Where Rule 6.4 (applies, each date is the date on which the status of international depositary authority was acquired.

**BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
COGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE**

INTERNATIONAL FORM

Prof. Dr. T. Chakraborty

**Institut f. Med. Mikrobiologie
-Infektionsimmunologie-
Frankfurter Str. 107
D-35392 Gießen**

VIABILITY STATEMENT

issued pursuant to Rule 10.2 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
(identified at the bottom of this page)

I. DEPOSITOR	II. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM
Name: Prof. Dr. T. Chakraborty Address: Institut f. Med. Mikrobiologie -Infektionsimmunologie- Frankfurter Str. 107 D-35392 Gießen	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: <p align="center">DSM 11881</p> Date of the deposit or the transfer: <p align="center">1997-12-09</p>
III. VIABILITY STATEMENT	
The viability of the microorganism identified under II above was tested on 1997-12-09 . On that date, the said microorganism was <input checked="" type="checkbox"/> viable <input type="checkbox"/> no longer viable	
IV. CONDITIONS UNDER WHICH THE VIABILITY TEST HAS BEEN PERFORMED	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Address: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s): <p align="center"><i>V. Weiss</i></p> Date: 1997-12-16

Indicate the date of original deposit or, where a new deposit or a transfer has been made, the most recent relevant date (date of the new deposit or date of the transfer).

In the cases referred to in Rule 10.2(a) (ii) and (iii), refer to the most recent viability test.

Mark with a cross the applicable box.

Fill in if the information has been requested and if the results of the test were negative.


BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
COGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

INTERNATIONAL FORM

Prof. Dr. T. Chakraborty

Institut f. Med. Mikrobiologie
-Infektionsimmunologie-
Frankfurter Str. 107
D-35392 Gießen

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT
Issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
Identified at the bottom of this page

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification references given by the DEPOSITOR: EGD delta actA delta plcB	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: DSM 11882
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I. above was accompanied by: <input checked="" type="checkbox"/> a scientific description <input checked="" type="checkbox"/> a proposed taxonomic designation (Mark with a cross where applicable).	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I. above, which was received by it on 1997-12-09 (Date of the original deposit).	
IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION	
The microorganism identified under I. above was received by this International Depositary Authority on (date of original deposit) and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on (date of receipt of request for conversion).	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Address: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s):  Date: 1997-12-16

¹ Where Rule 6.4 (d) applies, such date is the date on which the status of International depositary authority was acquired.
 Form DSMZ-BP/4 (sole page) 0196

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

INTERNATIONAL FORM

Prof. Dr. T. Chakraborty

Institut f. Med. Mikrobiologie
-Infektionsimmunologie-
Frankfurter Str. 107
D-35392 Gießen

VIABILITY STATEMENT

issued pursuant to Rule 10.2 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

I. DEPOSITOR		II. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Name: Prof. Dr. T. Chakraborty Address: Institut f. Med. Mikrobiologie -Infektionsimmunologie- Frankfurter Str. 107 D-35392 Gießen		Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: DSM 11882 Date of the deposit or the transfer: 1997-12-09	
III. VIABILITY STATEMENT			
The viability of the microorganism identified under II above was tested on 1997-12-09. On that date, the said microorganism was <input checked="" type="checkbox"/> viable <input type="checkbox"/> no longer viable			
IV. CONDITIONS UNDER WHICH THE VIABILITY TEST HAS BEEN PERFORMED			
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY			
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GMBH Address: Marchenauer Weg 1b D-38124 Braunschweig		Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s): <i>V. Weis</i> Date: 1997-12-16	

1. Indicate the date of original deposit or, where a new deposit or a transfer has been made, the most recent relevant date (date of the new deposit or date of the transfer).
2. In the cases referred to in Rule 10.2(a) (i) and (ii), refer to the most recent viability test.
3. Mark with a cross the appropriate box.
4. Fill in if the information has been requested and if the results of the test were negative.


**BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
DEPOSITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE**

INTERNATIONAL FORM

Prof. Dr. T. Chakraborty

**Institut f. Med. Mikrobiologie
-Infektionsimmunologie-
Frankfurter Str. 107
D-35392 Gießen**

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT
issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR: EGD delta espL1	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: DSM 11883
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I. above was accompanied by: <input checked="" type="checkbox"/> a scientific description <input checked="" type="checkbox"/> a proposed taxonomic designation (Mark with a cross where applicable).	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I. above, which was received by it on 1997-12-09 (Date of the original deposit).	
IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION	
The microorganism identified under I. above was received by this International Depositary Authority on (date of original deposit) and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on (date of receipt of request for conversion).	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Address: Marschner Weg 1b D-38124 Braunschweig	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s):  Date: 1997-12-16

¹ Where Rule 6.4 (c) applies, such date is the date on which the status of international depositary authority was acquired.

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

INTERNATIONAL FORM

Prof. Dr. T. Chakraborty
Institut f. Med. Mikrobiologie
-Infektionsimmunologie-
Frankfurter Str. 107
D-35392 Gießen

VIABILITY STATEMENT
Issued pursuant to Rule 10.2 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
Identified at the bottom of this page

I. DEPOSITOR	II. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM
Name: Prof. Dr. T. Chakraborty Address: Institut f. Med. Mikrobiologie -Infektionsimmunologie- Frankfurter Str. 107 D-35392 Gießen	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: DSM 11003 Date of the deposit or the transfer: 1997-12-09
III. VIABILITY STATEMENT	
The viability of the microorganism identified under II above was tested on 1997-12-09: On that date, the said microorganism was <input checked="" type="checkbox"/> viable <input type="checkbox"/> no longer viable	
IV. CONDITIONS UNDER WHICH THE VIABILITY TEST HAS BEEN PERFORMED	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Address: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s): <i>V. Wechs</i> Date: 1997-12-16

1 Indicate the date of original deposit or, where a new deposit or a transfer has been made, the most recent relevant date (date of the new deposit or
 2 date of the transfer).
 3 In the cases referred to in Rule 10.2(a) (ii) and (iii), refer to the most recent viability test.
 4 Mark with a cross the applicable box.
 5 Fill in if the information has been requested and if the results of the test were negative.

INTERNATIONALE RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/08096

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 C12N15/87 C12N15/85 C07K14/195 C12N1/21 C12R1/01
A01K67/027 A61K48/00

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C12N C07K C12R A01K A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	FR 2 743 086 A (PASTEUR INSTITUT) 4. Juli 1997	1-8, 12
Y	siehe das ganze Dokument	15, 16
X	COURVALIN P ET AL: "GENE TRANSFER FROM BACTERIA TO MAMMALIAN CELLS" COMPTES RENDUS DES SEANCES DE L'ACADEMIE DES SCIENCES SERIE III: SCIENCES DE LA VIE, Bd. 318, Nr. 12, 1. Dezember 1995, Seiten 1207-1212, XP000579701	1-8, 12
Y	siehe das Beispiel mit Plasmid pAT497 siehe Abbildungen 1-3	15, 16
	--- -/--	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

3. Juni 1999

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

16/06/1999

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Hornig, H

INTERNATIONALER CHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/08096

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 97 08955 A (US ARMY ;BRANSTROM ARTHUR A (US); SIZEMORE DONATA R (US); SADOFF J) 13. März 1997	1-10,12, 17,18, 20,21
Y	siehe Seite 26, Zeile 19 - Zeile 30 siehe Seite 36, Zeile 24 - Seite 38, Zeile 12; Ansprüche 1-44 ---	1-10,15, 16
Y	PASCUAL D W ET AL: "ORAL BACTERIAL VACCINE VECTORS FOR THE DELIVERY OF SUBUNIT AND NUCLEIC ACID VACCINES TO THE ORGANIZED LYMPHOID TISSUE OF THE INTESTINE" BEHRING INSTITUTE: MITTEILUNGEN, Bd. 98, Februar 1997, Seiten 143-152, XP002910650 siehe Seite 148, linke Spalte, Zeile 20 - Zeile 25 ---	1-10,15, 16
A	WO 96 40238 A (UNIV YALE) 19. Dezember 1996 siehe das ganze Dokument ---	1-22
A	WO 93 15212 A (PASTEUR INSTITUT) 5. August 1993 siehe das ganze Dokument ---	1-22
A	T. CHAKRABORTY AND J. WEHLAND: "The host cell infected with Listeria monocytogenes in" HOST RESPONSE TO INTRACELLULAR PATHOGENS, ED. S.H.E. KAUFMANN R.G. LANDES CO.,1997, Seiten 271-290, XP002104783 Austin, US in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	1-22
A	S. DRAMSI ET AL.: "Identification of four new members of the internalin multigen family of Listeria monocytogenes EGD" INFECTION AND IMMUNITY, Bd. 65, Nr. 5, Mai 1997, Seiten 1615-1625, XP002104784 ASM, WASHINGTON, DC, US siehe das ganze Dokument ---	1-22
P,X	WO 98 44131 A (SIZEMORE DONATA R ;GROVE JASON C (US); SADOFF JERALD C (US); WALTE) 8. Oktober 1998 siehe das ganze Dokument ---	1-8,12, 18
P,X	WO 98 48026 A (BIOTECHNOLOG FORSCHUNG GMBH ;GUZMAN CARLOS (DE); DARJI AYUB (DE);) 29. Oktober 1998 siehe das ganze Dokument ---	1-8, 12-16,18

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P,X	G. DIETRICH ET AL.: "Delivery of antigen-encoding plasmid DNA into the cytosol of macrophages by attenuated suicide <i>Listeria monocytogenes</i> " NATURE BIOTECHNOLOGY, Bd. 16, Nr. 1, Januar 1998, Seiten 181-185, XP002104785 NATURE PUBL. CO., NEW YORK, US siehe das ganze Dokument ----	1-10, 12-14, 17,18
P,X	C.A. GUZMÁN ET AL.: "Attenuated <i>Listeria monocytogenes</i> carrier strains can deliver an HIV-1 gp120 T helper epitope to MHC class II-restricted human CD4+ T cells" EUROPEAN J. IMMUNOLOGY, Bd. 28, Juni 1998, Seiten 1807-1814, XP002104786 VCH VERLAGSGESELLSCHAFT MBH, WEINHEIM, BRD siehe das ganze Dokument ----	1-14,17, 18
P,X	C. GRILLOT-COURVALIN ET AL.: "Functional gene transfer from intracellular bacteria to mammalian cells" NATURE BIOTECHNOLOGY, Bd. 16, Nr. 9, September 1998, Seiten 862-866, XP002104787 NATURE PUBL. CO., NEW YORK, US siehe das ganze Dokument ----	1-8,12
P,A	D. RAFFELSBAUER ET AL.: "The gene cluster <i>inlC2DE</i> of <i>Listeria monocytogenes</i> contains additional new internalin genes and is important for virulence in mice" MOLECULAR & GENERAL GENETICS, Bd. 260, Nr. 2,3, November 1998, Seiten 144-158, XP002104788 SPRINGER INTERNATIONAL, AMSTERDAM, NL siehe das ganze Dokument -----	11,14

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/08096

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
Bemerkung: Obwohl der(die) Anspruch(üche) 1-11, 15-20, 22
sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen
K rpers bezieht(en), wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich
auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.
2. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen,
daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

INTERNATIONALER RESEARCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/08096

Im Recherchenbericht angeführtes Patentedokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
FR 2743086	A	04-07-1997	KEINE		
WO 9708955	A	13-03-1997	US	5824538 A	20-10-1998
			AU	7105996 A	27-03-1997
			CA	2231332 A	13-03-1997
			EP	0881884 A	09-12-1998
WO 9640238	A	19-12-1996	AU	6385196 A	30-12-1996
			CA	2224075 A	19-12-1996
			CN	1192694 A	09-09-1998
			EP	0833660 A	08-04-1998
WO 9315212	A	05-08-1993	FR	2686896 A	06-08-1993
WO 9844131	A	08-10-1998	AU	6868198 A	22-10-1998
WO 9848026	A	29-10-1998	AU	5756298 A	13-11-1998

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 98/08096

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/87 C12N15/85 C07K14/195 C12N1/21 C12R1/01
A01K67/027 A61K48/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N C07K C12R A01K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FR 2 743 086 A (PASTEUR INSTITUT) 4 July 1997	1-8, 12
Y	see the whole document	15, 16
X	COURVALIN P ET AL: "GENE TRANSFER FROM BACTERIA TO MAMMALIAN CELLS" COMPTES RENDUS DES SEANCES DE L'ACADEMIE DES SCIENCES SERIE III: SCIENCES DE LA VIE, vol. 318, no. 12, 1 December 1995, pages 1207-1212, XP000579701	1-8, 12
Y	See example with Plasmid pAT497 see figures 1-3	15, 16
	--- -/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

3 June 1999

Date of mailing of the international search report

16/06/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Hornig, H

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 98/08096

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 97 08955 A (US ARMY ;BRANSTROM ARTHUR A (US); SIZEMORE DONATA R (US); SADOFF J) 13 March 1997	1-10,12, 17,18, 20,21
Y	see page 26, line 19 - line 30 see page 36, line 24 - page 38, line 12; claims 1-44	1-10,15, 16
Y	--- PASCUAL D W ET AL: "ORAL BACTERIAL VACCINE VECTORS FOR THE DELIVERY OF SUBUNIT AND NUCLEIC ACID VACCINES TO THE ORGANIZED LYMPHOID TISSUE OF THE INTESTINE" BEHRING INSTITUTE: MITTEILUNGEN, vol. 98, February 1997, pages 143-152, XP002910650 see page 148, left-hand column, line 20 - line 25	1-10,15, 16
A	--- WO 96 40238 A (UNIV YALE) 19 December 1996 see the whole document	1-22
A	--- WO 93 15212 A (PASTEUR INSTITUT) 5 August 1993 see the whole document	1-22
A	--- T. CHAKRABORTY AND J. WEHLAND: "The host cell infected with Listeria monocytogenes in" HOST RESPONSE TO INTRACELLULAR PATHOGENS, ED. S.H.E. KAUFMANN R.G. LANDES CO.,1997, pages 271-290, XP002104783 Austin, US cited in the application see the whole document	1-22
A	--- S. DRAMSI ET AL.: "Identification of four new members of the internalin multigen family of Listeria monocytogenes EGD" INFECTION AND IMMUNITY, vol. 65, no. 5, May 1997, pages 1615-1625, XP002104784 ASM, WASHINGTON, DC, US see the whole document	1-22
P,X	--- WO 98 44131 A (SIZEMORE DONATA R ;GROVE JASON C (US); SADOFF JERALD C (US); WALTE) 8 October 1998 see the whole document	1-8,12, 18
P,X	--- WO 98 48026 A (BIOTECHNOLOG FORSCHUNG GMBH ;GUZMAN CARLOS (DE); DARJI AYUB (DE);) 29 October 1998 see the whole document	1-8, 12-16,18
	--- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l Application No

PCT/EP 98/08096

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	G. DIETRICH ET AL.: "Delivery of antigen-encoding plasmid DNA into the cytosol of macrophages by attenuated suicide <i>Listeria monocytogenes</i> " NATURE BIOTECHNOLOGY, vol. 16, no. 1, January 1998, pages 181-185, XP002104785 NATURE PUBL. CO., NEW YORK, US see the whole document	1-10, 12-14, 17,18
P,X	C.A. GUZMÁN ET AL.: "Attenuated <i>Listeria monocytogenes</i> carrier strains can deliver an HIV-1 gp120 T helper epitope to MHC class II-restricted human CD4+ T cells" EUROPEAN J. IMMUNOLOGY, vol. 28, June 1998, pages 1807-1814, XP002104786 VCH VERLAGSGESELLSCHAFT MBH, WEINHEIM, BRD see the whole document	1-14,17, 18
P,X	C. GRILLOT-COURVALIN ET AL.: "Functional gene transfer from intracellular bacteria to mammalian cells" NATURE BIOTECHNOLOGY, vol. 16, no. 9, September 1998, pages 862-866, XP002104787 NATURE PUBL. CO., NEW YORK, US see the whole document	1-8,12
P,A	D. RAFFELSBAUER ET AL.: "The gene cluster <i>inlC2DE</i> of <i>Listeria monocytogenes</i> contains additional new internalin genes and is important for virulence in mice" MOLECULAR & GENERAL GENETICS, vol. 260, no. 2,3, November 1998, pages 144-158, XP002104788 SPRINGER INTERNATIONAL, AMSTERDAM, NL see the whole document	11,14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 98/08096

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Observation: Although Claim(s) 1-11, 15-20, 22 relate(s) to a method for treatment of the human/animal body, the search was carried out and was based on the cited effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 98/08096

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
FR 2743086	A	04-07-1997	NONE	
WO 9708955	A	13-03-1997	US 5824538 A AU 7105996 A CA 2231332 A EP 0881884 A	20-10-1998 27-03-1997 13-03-1997 09-12-1998
WO 9640238	A	19-12-1996	AU 6385196 A CA 2224075 A CN 1192694 A EP 0833660 A	30-12-1996 19-12-1996 09-09-1998 08-04-1998
WO 9315212	A	05-08-1993	FR 2686896 A	06-08-1993
WO 9844131	A	08-10-1998	AU 6868198 A	22-10-1998
WO 9848026	A	29-10-1998	AU 5756298 A	13-11-1998

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12N 15/87, 15/85, C07K 14/195, C12N 1/21, C12R 1/01, A01K 67/027, A61K 48/00	A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/29884 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 17. Juni 1999 (17.06.99)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/08096 (22) Internationales Anmeldedatum: 11. Dezember 1998 (11.12.98) (30) Prioritätsdaten: 197 54 938.1 11. Dezember 1997 (11.12.97) DE (71)(72) Anmelder und Erfinder: VON EICHEL-STREIBER, Christoph [DE/DE]; Bingerweg 15, D-55444 Schwenningen (DE). CHAKRABORTY, Trinad [SG/DE]; Seltersweg 85, D-35390 Giessen (DE). (74) Anwalt: KEIL & SCHAAFHAUSEN; Cronstetten Strasse 66, D-60322 Frankfurt am Main (DE).	(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>	
(54) Title: TGC METHOD FOR INDUCING TARGETED SOMATIC TRANSGENESIS (54) Bezeichnung: TGC-VERFAHREN ZUR INDUKTION EINER ZIELGERICHTETEN, SOMATISCHEN TRANSGENITÄT (57) Abstract <p>Disclosed is a TGC method for inducing targeted somatic transgenesis in an animal host, whereby bacteria with a foreign DNA integrated into an episomal vector release, under the control of eukaryotic regulatory elements for ulterior transcription and expression, said foreign DNA in the case of infection of a foreign organism, organ, tissue, cell line or individual cells, causing transcription and expression of foreign DNA and/or foreign protein in said location.</p> (57) Zusammenfassung <p>Es wird ein TGC-Verfahren zur Induktion einer zielgerichteten somatischen Transgenität in einem animalen Wirt beschrieben, bei dem Bakterien mit einer in einen episomalen Vektor integrierten und unter der Kontrolle eukaryonter, regulatorischer Elemente zur späteren Transkription und Expression stehender Fremd-DNA bei der Infektion eines fremden Organismus, eines Organs, eines Gewebes einer Zelllinie oder einzelner Zellen die Fremd-DNA freisetzen und damit dort die Transkription und Expression von Fremd-DNA und/oder Fremd-Protein bewirken.</p>		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

- 1 -

5 **TGC-Verfahren zur Induktion einer zielgerichteten, somatischen Transgenität**

10 Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Induktion einer
zielgerichteten, somatischen Transgenität (TGC = targeted
genetic conditioning), das zur Expression von Fremdproteinen
in Zellen, einem Gewebe, einem Organ oder einem ganzen
15 Wirtsorganismus sowie zur somatischen Gentherapie eingesetzt
wird.

Es ist bekannt, daß Proteine für technische Anwendungen oder
für therapeutische Zwecke durch den Transfer von Genen in
Mikroorganismen oder Säugetierzellen in ausreichenden Mengen
20 exprimiert werden können. Diese Verfahren sind besonders
bedeutsam für körpereigene Proteine, die sonst nicht oder nur
begrenzt zugänglich sind, wie Hormone, Regulationsfaktoren,
Enzyme, Enzyminhibitoren und humanisierte monoklonale
Antikörper sowie für die Herstellung von Oberflächenproteinen
25 pathogener Mikroorganismen oder viraler Hüllproteine zur
gefahrlosen Herstellung diagnostischer Tests und verträglicher
Impfstoffe. Durch "Protein-Engineering" können auch neuartige
Proteine hergestellt werden, die durch Fusion, Mutation oder
Deletion entsprechender DNA-Sequenzen anwendungs-optimierte
30 Eigenschaften erhalten, zum Beispiel Immuntoxine.

Aus menschlichen Zellen gewonnene Gene sind auch in Maus-,
Ratten- oder Schafzellen funktionsfähig und führen dort zur
Bildung entsprechender Genprodukte. Dies wurde bereits
35 praktisch bei der Herstellung von therapeutischen Proteinen,

- 2 -

zum Beispiel in der Milch transgener Nutztiere, angewendet. Der bisher bekannte Weg hierfür ist die Mikroinjektion entsprechender Fremd-DNA-tragender Vektoren in den Kern der befruchteten Eizelle, in der bei einer Ausbeute von 1% die DNA dann in das Chromosom eingebaut wird. Die transgene befruchtete Eizelle wird anschließend hormonell stimulierten Muttertieren reimplantiert. Ein Nachkomme, der das eingeschleuste Gen in allen Körperzellen trägt, ist die Grundlage für die Bildung einer "transgenen Herde". Durch die Nutzung der Gentechnik ist es möglich geworden, landwirtschaftliche Nutztiere so gezielt zu verändern, daß sie menschliche Proteine in ihrem Blut, ihrem Gewebe oder der Milch produzieren, die in Mikroorganismen oder Pflanzen nicht hergestellt werden können.

Der Einsatz von transgenen Tieren als Proteinproduktionsfabriken hat jedoch den entscheidenden Nachteil, daß hierzu ein Eingriff in die Keimbahn der Tiere erforderlich ist. Wegen des hohen technischen und zeitlichen Aufwandes zur Schaffung und Züchtung von transgenen Tieren und auch wegen der Diskussion über die ethischen Konsequenzen dieser Methoden sind alternative Methoden zur Proteinproduktion in einem animalen Wirt ohne Keimbahneingriff erforderlich und wären von sehr großem Vorteil.

Es ist weiterhin bekannt, daß die Milch von Säugetieren wie Kühen, Schafen, Ziegen, Pferden oder Schweinen eine Reihe von bakteriellen Krankheitserregern enthalten kann. Darunter sind Listerien, Mykobakterien, Brucellen, Rhodococcus, Salmonellen, Shigellen, Escherichia, Aeromonaden und Yersinien, oder generell Bakterien mit intrazellulärem Lebensstil [1, 2]. Diese Bakterien werden im wesentlichen durch orale Aufnahme auf den Menschen oder das Tier übertragen [3], aber auch Tröpfcheninfektionen spielen eine Rolle. Eine Hauptquelle für die Infektion des Menschen mit Listerien [4], Mykobakterien

- 3 -

- [5] und *Escherichia coli* ist kontaminierte Milch [6]. Der Mensch nimmt die Bakterien beim Verzehr nicht pasteurisierter Milch oder Milchprodukte auf. Die anderen oben aufgeführten Bakteriengattungen wie Salmonellen, Shigellen, Yersinien, Rhodococcus und Brucellen werden in ähnlicher Weise auf den Menschen übertragen. Bakterien können aber auch durch andere mit Bakterien infizierte Tierprodukte aus der Kuh, der Ziege, dem Schaf, dem Hasen, dem Pferd, dem Schwein oder dem Geflügel in den Menschen gelangen.
- Die Infektion der Tiere erfolgt dabei oft über mukosale Oberflächen, sehr häufig über den Verdauungstrakt. Nach der Aufnahme von Bakterien werden zum Beispiel im Fall von Listerien jedoch nicht alle Gewebe symptomatisch infiziert. Bei der Kuh und bei der Ziege steht die Infektion von Euter, Milz und Leber im Vordergrund des Infektionsgeschehens. Bei Schafen kann es außerdem auch zur Erkrankung des zentralen Nervensystems in Form der Meningitis kommen, so daß nicht alle Tiere die Infektion überleben. Mit der Infektion des Euters ist die Infektionskette geschlossen. Mit kontaminierter Milch aufgenommene Bakterien können dann das Tier, zum Beispiel das saugende Kalb, oder den Menschen über den Verdauungstrakt neu infizieren.
- Über den Weg der bakteriellen Infektion des Menschen, hier speziell dargestellt am Beispiel der Listerien, ist derzeit folgendes bekannt:
- Für den Menschen sind von den sechs bekannten *Listeria*-Spezies lediglich *L.monocytogenes* und *L.ivanovii* [7] pathogen. Die Erkrankung des Menschen erfolgt beim Verzehr infizierter Milch oder Milchprodukte. Der Verlauf der Infektion hängt vom Gesundheitszustand des Menschen ab und ist in aller Regel undramatisch. In der Schwangerschaft kann es zu der intrauterinen Übertragung des Keims auf den Fetus kommen,

- 4 -

verbunden mit Fehl-, Tod- oder Frühgeburten. In allen Fällen besteht eine exzellente und problemlose Behandelbarkeit mit Antibiotika wie Ampicillin oder Erythromycin [8; 8a].

5 Für *L.monocytogenes* in Mensch und Tier, für *L.ivanovii* im Schaf, ist der Weg in die Zelle gut definiert. Zur vollen Pathogenität der Listerien sind eine Reihe von Pathogenitätsfaktoren notwendig. Dazu gehört PrfA (positive regulator of virulence), ActA (actin nucleating protein), PlcA (phosphatidylinositol-specific phospholipase), PlcB (phosphatidylcholine-specific phospholipase), Hly (listeriolysin), Mpl (metalloprotease) [9]. Die Zellspezifität der Pathogen-Wirtszelle-Interaktion wird über eine Reihe von Proteinen vermittelt. Dazu gehören die Internaline InlA und InlB, die
10 am initialen Kontakt und der Interaktion von Bakterien und Zelloberfläche beteiligt sind [10, 11]. *L.monocytogenes* kann in der experimentellen Situation unter anderem Endothelzellen, Epithelzellen, Fibroblasten und Hepatozyten infizieren. Darüber hinaus infiziert *L.monocytogenes* mit neutrophilen
15 Granulocyten, Makrophagen und Lymphozyten auch Zellen des weißen Blutbildes. Dies ist ein wesentlicher Faktor bei der Übertragung der Bakterien von der Eintrittspforte zum Zielorgan im Wirt. Schließlich kann auch das Lungengewebe durch Listerien infiziert werden, wenn man die Bakterien über
20 Tröpfcheninfektion appliziert.

Nach der Adhäsion an der Zelloberfläche wird *L.monocytogenes* durch Endozytose in die Zelle eingeschleust, zerstört unter der Einwirkung von Listeriolysin (Hly) die Endosomenmembran und wird so in das Zellzytosol freigesetzt [14]. In der Zelle
30 angekommen, kann sich der Keim vermehren. Unter der Produktion weiterer Proteine bleibt das vollpathogene Bakterium nicht ortsständig, sondern bewegt sich aktiv fort. Die Fortbewegung wird durch die Ausnutzung einer Reihe von *L.monocytogenes* eigenen und einiger zelleigener Proteine bewerkstelligt [15,
35

- 5 -

16]. ActA wird auf der Zelloberfläche der *L.monocytogenes* exprimiert. Es bindet das zelluläre Protein VASP, das seinerseits die Brücke zur Anheftung von zellulären Aktin bildet. Im weiteren Verlauf bilden sich Aktinschweife aus, die
5 das Bakterium an seiner Spitze tragen und es so durch die Zelle weiterbewegen. Trifft *L.monocytogenes* auf die Zellmembran, so entsteht eine Membranprotrusion, die bei benachbarten Zellen direkt in die Nachbarzelle hineinragt. Diese Ausstülpung wird dann von der Nachbarzelle endozytiert, so daß
10 *L.monocytogenes* sich in der neuen Zelle innerhalb einer zweifachen Membran befindet. Die beiden Membranen werden unter Einwirkung von Hly und PlcB aufgelöst [17]. Am Ende dieses Vorganges hat *L.monocytogenes* auch die Nachbarzelle infiziert und der Infektionsprozeß beginnt von Neuem. So gelangt
15 *L.monocytogenes* unter anderem in die sekretorischen Zellen des Euters wie der Kuh. Sekretierte Listerienproteine werden in der Milch nachweisbar, d.h. sie werden intrazellulär aus der laktierenden Zelle in die Milch abgegeben [18]. Zu diesen Proteinen zählen mit Hly (Listeriolysin) und IrpA (internalin
20 related protein [19]) zwei Pathogenitätsfaktoren, die von *L.monocytogenes* im Wirt in großen Mengen produziert, sezerniert und in die Milch ausgeschieden werden [20].

Diese Kenntnisse des Infektionsprozesses haben es ermöglicht,
25 *L.monocytogenes* genetisch so zu verändern, daß er fremde Proteine exprimiert. Beispiele für die Expression fremder Proteine in *L.monocytogenes* sind: Alkalische Phosphatase aus *Escherichia coli*, das Nucleoprotein aus dem Lymphochoriomeningitis virus (LCMV), das Nucleoprotein aus dem Influenza virus,
30 das "major capsid protein" (L1) aus cottontail rabbit papillomavirus (CRPV) und das Gag Protein aus HIV Typ 1 [20 bis 27].

Neben Proteinen prokaryonten Ursprungs handelt es sich hierbei
35 um virale Proteine, die normalerweise nicht innerhalb der

- 6 -

eukaryonten Zelle produziert werden. Solche und ähnliche Fremdproteine prokaryonten und eukaryonten Ursprungs können von *L.monocytogenes* produziert werden, ohne daß eine eukaryonte Zelle dazu notwendig ist. Von *L.monocytogenes* produzierten Proteine werden in der Milch ausgeschieden.

Die Infektion durch Bakterien erfolgt durch spezifische Interaktionen von Liganden-Proteinen der Bakterien mit Rezeptor-Proteinen der Zielzellen. Hieran ist im Falle von *L.monocytogenes* die Internalinfamilie maßgeblich beteiligt; sie bestimmt im wesentlichen die Zellspezifität des Infektionsprozesses [28]. Zudem wird eine ActA abhängige Zellaufnahme diskutiert, die über Rezeptoren der Heparansulfatfamilie vermittelt wird [29]. Infiziert *L.monocytogenes* die Zelle, so kommt es nicht in jedem Fall zu einem vollen Infektionszyklus. Wird in *L.monocytogenes* Listeriolysin ausgeschaltet, so bleiben die Bakterien im Endosom stecken und die Infektion der "ersten Zelle" kommt nicht zu Stande. Bakterien, in denen das Protein ActA ausgeschaltet, inaktiv oder nicht mehr vorhanden ist, kommen in die erstinfizierten Zellen, bleiben aber dort stecken und können die Nachbarzellen nicht mehr infizieren [30, 31]. Bei der Ausschaltung der PclB ist der Keim nicht mehr in der Lage, sich in einer zweiten Zelle zu etablieren.

L.monocytogenes ist ein Bakterium, das durch eine Reihe von Antibiotika behandelt werden kann. Besonders geeignet sind Ampicillin und Penicillin (jeweils in Kombination mit Gentamycin). Als Alternative werden auch Erythromycin und Sulfonamide eingesetzt. In besonderen Fällen kommen Tetracykline, Vancomycin oder Chloramphenicol zum Einsatz [32]. Entsprechende Behandlungsmöglichkeiten bestehen auch für andere Bakterien [8a] der Gattungen *Aeromonas*, *Bartonella*, *Brucella*, *Campylobacter*, *Enterobacteriaceae*, *Mycobacterium*, *Renibacterium*, *Rhodococcus* oder andere Bakterien, die mit dem genannten Bakterien genetisch oder biochemisch verwandt sind.

- 7 -

Unter Berücksichtigung dieser Erkenntnisse stellte sich nun die Aufgabe, eine bakterielle Infektion für ein Verfahren zur organotropen Proteinproduktion zu nutzen.

- 5 Gelöst wird diese Aufgabe durch das ein TGC-Verfahren zur Induktion einer zielgerichteten, somatischen Transgenität, bei dem Bakterien, die eine Fremd-DNA tragen, welche in einem episomalen Vektor integriert und zur späteren Transkription und Expression vorbereitet ist, bei der Infektion von Zellen,
10 Geweben, einem Organ oder dem ganzen Wirtsorganismus ihre genetischen Informationen in die infizierte Einzelzelle freisetzen und damit die Expression von Fremdprotein bewirken.

- Dieses Verfahren kann entweder zur Gewinnung eines Fremd-
15 proteins eingesetzt werden, dient aber vorteilhaft auch zur somatischen Gentherapie, bei der die durch die bakterielle Infektion in den Wirtsorganismus eingeführte Fremd-DNA dort die Bildung eines dem Wirtsorganismus fehlenden Proteins veranlaßt oder durch die Erzeugung von einzel- oder doppel-
20 strängiger Nukleinsäure die Bildung eines Proteins im Wirtsorganismus erhöht, vermindert oder verhindert. Dieses Verfahren kann auf alle bekannten Nutztiere und auch auf den Menschen angewendet werden.

- 25 Handelt es sich bei dem infizierten Gewebe um das Ei eines Geflügeltieres, so wird das Fremdprotein im Ei produziert und kann aus diesem durch die bekannten Verfahren der Isolierung von Proteinen, zum Beispiel aus Hühnereiern, isoliert werden. Handelt es bei den infizierten Zellen um Zellen des Blutes,
30 so kann durch parenterale Infektion der Zellen eine Verbreitung der Bakterien und mit ihnen der Fremd-DNA im injizierten Gesamtorganismus erzielt werden. Handelt es sich bei den Wirtstieren um Versuchstiere, deren infiziertes Organ ein Euter ist, so wird in der Milch des Versuchstieres das

gewünschte Fremdprotein produziert, aus der das Fremd-Protein dann isoliert werden kann.

Das TGC-Verfahren wird im folgenden exemplarisch für das
5 Bakterium *L.monocytogenes* besprochen. Es kann entsprechend
aber auch bei allen intrazellulär wachsenden Bakterien
angewendet werden, unter denen die Bakterien der Gattungen
Aeromonas, *Bartonella*, *Brucella*, *Campylobacter*, *Clostridia*,
Enterobacteriaceae (bei letzterer insbesondere Bakterien der
10 Spezies *Yersinia*, *Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella*),
Legionella, *Mycobacterium*, *Renibacterium*, *Rhodococcus* oder
Bakterien aus mit ihnen genetisch oder biochemisch verwandten
Gattungen hervorzuheben sind, obwohl auch andere Bakterien-
Gattungen, die nicht pathogen sind und auch keinen intrazel-
15 ulären Lebensstil haben, für das erfindungsgemäße Verfahren
geeignet sind, sofern sie in einem eukaryonten Wirtsorganismus
lebensfähig sind.

Es ist außerdem möglich, das TGC-Verfahren mit von Hause aus
20 apathogenen Bakterien durchzuführen, die durch genetische
Manipulationen mit zusätzlichen Faktoren ausgestattet werden,
die ihnen den Zutritt zur Zelle ermöglichen. Zu einer
derartigen "Aufrüstung mit Pathogenitätsfaktoren" können viele
von Hause aus nicht intrazellulär wachsende Bakterien
25 herangezogen werden, wie *Bacillus subtilis*, *Lactobacillen*,
Pseudomonaden, *Staphylokokken*. Ein in diesem Sinn aufgerüste-
ter TGC-Sicherheitsstamm ist zum Beispiel *Bacillus subtilis*,
der zusätzlich mit dem *Listeriolysin* aus *L.monocytogenes*
ausgerüstet ist. Ein Beispiel für die Aufrüstung von apathoge-
30 nen Bakterien zum TGC-Sicherheitsstamm wird mit der Aus-
stattung von *L.innocua* mit dem *hly* und/oder dem *actA* Gen aus
L.monocytogenes im Beispiel 1 angegeben. Ein weiteres Beispiel
ist *E.coli* K12 aufgerüstet mit dem *Invasin* (*inv*) aus
Yersinia pseudotuberculosis.

Das TGC-Verfahren wird in folgenden Schritten durchgeführt:

a) Klonierung der TGC-(Fremd)-DNA:

5 Das TGC-Verfahren wird durch die Vorbereitung des L.monocyto-
genes Stammes im Labor eingeleitet. In einen geeigneten Vektor
wird die cDNA für das herzustellende Fremdprotein insertiert.
Die Einfügung der cDNA wird dabei in bekannter Weise so
10 vorgenommen, daß die spätere Transkription und Expression im
eukaryontischen Wirt sichergestellt ist. Soll das Protein von
der Zelle sekretiert werden, so müssen die Vektoren passende,
wirtszellspezifische Signalsequenzen enthalten. Beim Vektor
kann es sich um einen eukaryonten Vektor handeln, zum Beispiel
um pCMV der Firma Clontech oder um pCMD der Firma Invitrogen,
15 beide käuflich zu erwerben. Als wesentliche Kriterien der
Auswahlvektoren weisen diese eukaryonte Promotoren, Donor und
Akzeptorstellen für das RNA-Splicing auf (fakultative
Eigenschaft), sowie eine Polyadenylierungsstelle zum Beispiel
aus SV40. Zur Vervielfältigung der DNA kann die Produktion der
20 genetischen Konstrukte (im folgenden als TGC-DNA bezeichnet)
in E. coli oder jedem anderem geeigneten Wirtstamm nach
Methoden vorgenommen werden. Die TGC-DNA muß zur primären
Klonierung lediglich in die ausgewählten Bakterien eingebracht
und dann später in den ausgewählten bakteriellen TGC-Si-
25 cherheitsstamm transferiert werden können. Der Transfer in
L.monocytogenes kann mit den verschiedenen, wohlbekannten
Methoden des Gentransfers von isolierter DNA (Transformation,
Elektroporation etc.) oder durch die Vorgänge der Konjugation
und der Transduktion direkt oder mittelbar von Bakterium zu
30 Bakterium vorgenommen werden.

b) TGC-Sicherheitsstämme als Rezipienten der TGC-DNA:

Als Rezipient der TGC-DNA werden besondere L.monocytogenes
35 Wirtsstämme - oder aber andere TGC-Ammen, die wie L.monocyto-

- 10 -

genes intrazellulär vitale Bakterien (z.B. Yersinien), oder ins Endosom-eindringende (z.B. Salmonellen) oder aber mit zusätzlichen bakteriellen Faktoren "aufgerüstete", ansonsten nicht pathogene Bakterien (z.B. Escherichia coli oder
5 L.innocua) darstellen - eingesetzt, die folgende Eigenschaften, einzeln oder in Kombination, erfüllen:

- 10 (A.1) sie eignen sich als Empfänger fremder DNA (genetische Manipulierbarkeit);
- (B.1) sie tragen Mutationen, die Gene betreffen, ohne die ein Überleben der Bakterien in der Außenwelt, also außerhalb eines Wirtes, zum Beispiel bei niedrigerer Temperatur, unmöglich ist (sicherheitsrelevante
15 Eigenschaft);
- (B.2) es sind attenuierte Wirtsstämme, bei denen ein Teil ihrer Pathogenitätsfaktoren deletiert oder inaktiviert ist, so daß sie nicht mehr die volle Pathogenität der Wildtypstämme entfalten (Attenuierung);
20
- (C.1) sie sind "genetische Krüppel", die durch gezielte, vom Experimentator eingeführte Stoffwechseldefekte nur auf definierten, artifiziellen Medien zur
25 Anzucht gebracht werden können, aufgrund dieser Defekte aber in der Zelle und vor allem im Ganztier nicht mehr wachsen, sich also nicht vermehren können ("endogener Suizid");
- 30 (C.2) sie induzieren ihre Aufnahme in Endosomen und werden in diesen Zellkompartimenten aufgelöst (Infektion über Endosomen)
- (C.3) sie werden von professionellen Phagozyten in
35 Phagolysosomen aufgenommen, können diese Zellkom-

- 11 -

partimente jedoch auflösen (d.h. überwinden)
(Infektion über Phagolysosomen)

5 (C.4) die Bakterien tragen Suizidgene, die erst nach dem
Eindringen in die Wirtszelle konditional aktiviert
werden, so daß die Bakterien sich selbst umbringen
("exogener Suizid")

10 (D.1) sie sind durch Antibiotikabehandlung des späteren
animalen Wirts zu eliminieren (Abtötung durch
Antibiose).

Bei Punkt A.1 handelt es sich um eine allgemeine Eigenschaft
der Bakterien, ohne die keine der angesprochenen genetischen
15 Manipulationen möglich wäre.

Unter den Punkten B.1 und B.2 sind Veränderungen zusammenge-
faßt, die die Anwendung der Bakterien sicherer machen.
Bakterien mit diesen Veränderungen können sich bei Aus-
20 scheidung in die Umwelt nicht mehr vermehren, bzw sind
attenuiert (B.1), weisen eine geringeres pathogenes Potential
auf (B.2). Die Veränderung von Bakterien gemäß Unterpunkt B.2
hat auch Einfluß auf die Freisetzung der Fremd-DNA in die
Zelle (siehe Unterpunkte C.2 + C.3).

25 Bei den Unterpunkten C.1 - C.4 handelt es sich um genetische
Veränderungen von Bakterien, die die Freisetzung der Fremd-DNA
in die animale Zelle maßgeblich bestimmen. Unter den Punkten
C.3 - C.4 sind Infektionswege aufgezeigt, die für Bakterien,
30 die weiter unten unter den Beispielen zusammengefaßt werden,
als Weg der Übertragung der Fremd-DNA in das Zytosol der
animalen Zelle identifiziert wurden.

Der unter (D.1) aufgeführte Eingriff erlaubt die gezielte
35 Abtötung der Bakterien. Dadurch wird die Freisetzung der

Fremd-DNA aus den Bakterien bewirkt, die Therapie mit Antibiotika ist aber auch ein sicherheitsrelevanter Aspekt.

Über die Veränderungen und Eingriffe gemäß C.1 - C.4 und auch
5 B.2 und D.1 wird die Freisetzung der rekombinanten DNA in die Zelle erst ermöglicht.

Stämme mit diesen Eigenschaften (einzeln oder in Kombination) werden als TGC-Sicherheitsstämme bezeichnet.

10

c) Optimierung der TGC-Amme auf das Zielorgan des TGC-Verfahrens:

Die TGC-DNA, die für das herzustellende Fremdprotein kodiert,
15 wird in den TGC-Sicherheitsstamm durch Transformation, Konjugation oder Transduktion überführt. Die so erhaltenen Stämme werden nachfolgend als TGC-Amme bezeichnet. Die Amme versorgt (füttert) den TGC-Wirt mit der DNA und induziert damit die somatische Transgenität. Damit während des TGC-
20 Verfahrens das gewünschte Fremdprotein optimal exprimiert wird, sollte sich das Gen vorteilhafterweise unter der Kontrolle von Promotoren und anderen regulatorisch wirkenden Sequenzen befinden, die aus dem vorher ausgewählten Zielorgan des TGC-Verfahrens stammen oder für das Zielorgan optimiert
25 sind, zum Beispiel Euter-spezifische Promotoren und Sekretionssignale.

d) Infektion des Wirtsorganismus mit der TGC-Amme:

30 Durch die Anzucht der TGC-Amme wird sie in vitro in einem Kulturmedium vermehrt und für die Durchführung des TGC-Verfahrens in einem ausgewählten Wirtsorganismus vorbereitet. Alternativ kann die TGC-Amme auch im dem Wirtsorganismus (Mensch oder Tier, im folgenden TGC-Wirt genannt), durch in
35 vivo Anzucht vermehrt. Als Vorbereitung für die Infektion wird

- 13 -

- die TGC-Amme in einer an den TGC-Wirt adaptierten, nicht bakteriziden Lösung, einem Puffer oder einer anderen physiologischen Flüssigkeit aufgenommen. Die Flüssigkeit wird dem TGC-Wirt, zum Beispiel dem laktierenden Säugetier, wenn das Euter somatisch transgen gemacht werden soll, verabreicht. Dies kann entweder peroral durch Trinken der Flüssigkeit oder aber durch Zuführung über eine Magensonde, den Anus oder eine andere Körperöffnung erfolgen. Als Alternative kommt die Gabe der TGC-Amme durch Injektion in Betracht, die intravenös, intramuskulär direkt in das Zielorgan oder vorzugsweise intraperitoneal erfolgt. Als weitere Alternative kann die Infektion durch Bildung eines Aerosols und anschließende Inhalation der Tröpfchen erfolgen.
- Der TGC-Wirt (Mensch oder Nutztier: Kuh, Pferd, Ziege, Schaf, Schwein, Hase, Geflügel etc.) kann mehrmals mit gleichen oder heterologen Transgenen infiziert werden. Durch mehrmalige Infektion mit unterschiedlicher DNA, die zum Beispiel für mehrere Enzyme eines Biosyntheseweges kodieren, können auf diese Weise ganze Enzymkaskaden in dem TGC-Wirt etabliert werden. Dadurch läßt sich auch die biochemische Expression multigener Proteine erreichen.

e) Organ- und Zellspezifität der Infektion:

- Der weitere Weg der TGC-Amme im Organismus ist zunächst durch den natürlichen Infektionsweg bestimmt. Die TGC-Amme erreicht auf dem für sie typischen und vom jeweiligen Bakterium gesteuerten Weg das Zielorgan. Trägt die TGC-Amme im Fall von *L.monocytogenes* genetisch unveränderte Internaline, so ist das Euter unter den Zielorganen. Genetisch veränderte Internaline erlauben die Infektion anderer Organsysteme. Seinem Infektionszyklus entsprechend dringt die TGC-Amme in die Zellen ein und erscheint im Zytoplasma. Da sie genetisch defekt ist, kann die TGC-Amme sich dort nicht weiter vermehren, sie begeht

"endogenen Suizid" (siehe oben, C.1 unter Aufzählungspunkt (b)). Bei der Zellinfektion hat die TGC-Amme die wirtsfremde TGC-DNA in ihrem Gepäck in die Zelle eingeschleust. Die Übertragung der Fremd-DNA in die Zelle kann aber auch durch
5 "exogenen Suizid" (siehe oben, C.4 unter Aufzählungspunkt (b)) oder durch "Abtötung" der Bakterien durch gezielte Antibiose (siehe oben, C.3 unter Aufzählungspunkt (b)) ausgelöst werden. In diesen drei Fällen stirbt die Bakterienzelle, die die Fremd-DNA in sich trägt, innerhalb der animalen Zelle und
10 entläßt dabei die Fremd-DNA ins Zytoplasma. Schließlich kann die Übertragung der Fremd-DNA auf die animale Zelle auch durch gezielte Infektion der Zellen unter Ausbleiben der Lyse der Endosomen erreicht werden. Hierbei wird die Fremd-DNA der animalen Zelle durch Lyse der Bakterien innerhalb der
15 Endosomen zugänglich.

In jedem der angesprochenen Fälle steht die in die Zelle übertragene DNA nun als Template zur Produktion des gewünschten Fremdproteins zur Verfügung. Die Nukleinsäure kann aber auch direkt therapeutisch wirken, zum Beispiel durch Generierung einer anti-sense RNA. Die so manipulierten Zellen, Gewebe
20 oder Organe werden im Verlauf der Infektion somatisch transgen.

25 f) *L.monocytogenes* induzierte Proteinproduktion in der Milch von Säugetieren:

Nach Ausführen des TGC-Verfahrens - zum Beispiel mit TGC-Ammen wie *L.monocytogenes* aber auch anderen intrazellulär vitalen Bakterien (z.B. *Yersinien*), oder ins Endosom eindringenden
30 (z.B. *Salmonellen*) oder aber mit zusätzlichen bakteriellen Faktoren aufgerüsteten, ansonsten nicht-pathogenen Bakterien (z.B. *Escherichia coli* oder *L.innocua*) - wird das Protein in der laktierenden Zelle gebildet und mit den anderen Produkten der Zelle in die Milch ausgeschieden. Werden mehrere
35 Tiere mit unterschiedlicher Fremd-DNA im TGC-Verfahren

- 15 -

somatisch transgen gemacht, so können durch Sammeln der Milch jedes einzelnen TGC-Wirtes (Melken) die unterschiedlichen Proteine voneinander getrennt produziert werden.

5 Aufgrund der Eigenschaften der TGC-Amme tauchen in der Milch keine *L.monocytogenes* (TGC-Ammen, d.h. Bakterien) auf. Sollte dies dennoch der Fall sein, so können die Bakterien mit allen dem Fachmann bekannten Methoden eliminiert werden, zum Beispiel durch Behandlung mit Antibiotika. Die Tiere (oder
10 auch der Mensch) sind nach der Durchführung des "targeted genetic conditioning" (TGC) frei von lebensfähigen, gentechnisch veränderten Organismen und unterliegen damit keinen weiteren Sicherheitsbestimmungen. Der TGC-Wirt gibt die in ihn durch das TGC-Verfahren eingetragene genetische Information
15 an die nachkommenden Zellen im Rahmen der üblichen Zellteilung weiter. Auf Abkömmlinge des TGC-Wirts wird die Information jedoch nicht übertragen, da die TGC-DNA sich nicht in der Keimbahn des TGC-Wirtes befindet. Das Umgehen (d.h. Auslassen) der genetischen Manipulation der Keimbahn des Gesamtorganismus und die gezielte Proteinproduktion im vorbestimmten Organ oder Gewebe des animalen Wirts (Tier und Mensch) stellt
20 den innovativen und neuen Aspekt des erfindungsgemäßen Verfahrens dar.

25 g) Infektionen von Geweben durch *L.monocytogenes*

Das Blut ist ein Gewebe, dessen erfindungsgemäße genetische Veränderung durch das TGC-Verfahren exemplarisch beschrieben wird. Die Zellen des Blutes eignen sich besonders für das TGC-
30 Verfahren. Die Infektion von Zellen des Blutes läßt sich außerhalb des Körpers vornehmen. Die zu erzielende somatische Transgenität der Zellen kann ebenfalls außerhalb des Wirtes überprüft werden. Im Fall der attenuierten, auxotrophen Bakterien lassen sich die zum Wachstum der Zellen notwendigen
35 Substanzen - als Beispiel für Auxotrophie dient hier die

Diaminopimelinsäure - dem Medium zufügen und so der Zeitraum der Lebensfähigkeit der Bakterien entsprechend dem Versuchsziel steuern. Durch anschließende Lyse der animalen Zellen kann dann überprüft werden, ob die intrazellulären Bakterien
5 noch vital sind.

Zur Reimplantation in den Empfängerorganismus werden schließlich die transfizierten Zellen verwendet, die eine genau bekannte Menge an vitalen Bakterien enthalten. Im Einzelfall
10 können dies so große Mengen an Bakterien sein, daß im Organismus weitere Organe infiziert werden. In anderen Fällen wird durch die Eliminierung vitaler Bakterien in vitro vor der Reimplantation in den TGC-Wirt die Transgenität gezielt auf das Gewebeblut beschränkt.

15 Die Reimplantation und damit verbunden die Disseminierung der transgenen Zellen mit oder ohne vitale Bakterien erlaubt die somatische Gentherapie von Zellen im Wirt, der in diesem Fall auch ein Mensch sein kann.

20 Das TGC-Verfahren ermöglicht es aber auch, extrakorporal Proteine zu produzieren. Dazu werden die TGC-Ammen in Eier von Geflügeltieren injiziert. Geeignete Techniken hierfür sind in der Impfstoffherstellung bei viralen Erregern bereits Stand
25 der Technik. Im Verlauf der Bebrütung der Eier werden die Zellen im Ei infiziert, somatisch transgen und produzieren dann das Fremdprotein. Aus dem Ei läßt sich nach bekannten Verfahren das Fremdprotein aufreinigen. Bei dieser Form des TGC-Verfahrens bleibt die TGC-Amme in allen Phasen der
30 Anwendung unter Laborbedingungen kontrollierbar. Die Menge des zu produzierenden Proteins hängt nur von der Injektion einer entsprechend großen Anzahl von Eiern ab.

h) Einsatz des TGC-Verfahrens zur somatischen Gentherapie:

Es gibt noch keine etablierte Form der somatischen Gentherapie. Derzeit wird die zur Transfektion eingesetzte Nukleinsäure im Inneren von Viren oder eingepackt in Liposomen vor Einflüssen der Außenwelt geschützt.

Viren haben den Nachteil, daß sie nur eine begrenzte Aufnahmefähigkeit haben und daß bei hohen Infektionsdosen mit der Entwicklung ihrer vollen zytopathischen Effekte zu rechnen ist [32a]. Sie induzieren Immunreaktionen und können so selber angegriffen und zerstört werden. Einige Viren werden durch Serum inaktiviert und werden dann für die Gentherapie unbrauchbar. Hier ist besonders die mehrfache Gabe von Viren zur Gentherapie zu nennen, in deren Verlauf die Immunantwort des Wirtes angestoßen wird. Die Bildung einer gezielten gegen die Viren gerichteten Abwehr stellte sich zuletzt als ein wesentliches Problem der Verwendung von Viren im Rahmen der Gentherapie heraus.

Beim Einsatz von Liposomen ist die toxische Wirkung der Lipide zu berücksichtigen, die entzündliche Reaktionen auslöst.

Im Fall der in vivo Therapie gibt es noch erhebliche Defizite auf dem Weg zu Anwendung der bisher benutzten Systeme des Gentransfers. Für diese Form der Therapie wird gefordert [32b]:

- (i) die Resistenz des Vektors gegen Abbau nach der in vivo Gabe im Körper,
- (ii) die Gewebsspezifität, d.h. das gezielte Ansteuern des zu therapierenden Gewebes (Organs) und

- (iii) die Sicherheit, womit die Unschädlichkeit der nicht zu behandelnden Organe gemeint ist [32b].

Die in dieser Patentanmeldung aufgeführten Bakterien, die hier
5 als Vehikel zum Gentransport und Gentransfer eingesetzt werden
können sollen, sind idealerweise für den Gentransfer geeignet.
Die Bakterien sind auf ihren jeweiligen Wirt bestens adaptiert
und können in ihm ohne äußere Eingriffe, wie Antibiotika-
Therapie für eine ausreichende Zeit überleben. Sie induzieren
10 auf definierten Infektionswegen spezifische Erkrankungen und
zeigen dabei zum Teil eine ausgeprägte Organotropie. Sie
können erhebliche Fremd-DNA Mengen aufnehmen (z.B. natürlich
vorkommende Plasmide haben Größen von mehreren 100 Kilobasen),
so daß nicht nur c-DNA's sondern sogar größere Bereiche eines
15 Chromosoms übertragen werden können. Schließlich können sie
sicher eingesetzt werden, insbesondere wenn es sich um
"Krüppelbakterien" handelt, wie sie oben beschrieben worden
sind. Die genetischen Defekte der TGC-Amme in Kombination mit
der vorgegebenen Antibiotika-Empfindlichkeit garantieren eine
20 effiziente Eliminierung der Bakterien, nachdem sie ihre
Aufgabe, den DNA-Transfer in die eukaryonte Zelle erfüllt
haben.

Beispiel:

25

Als Beispiele für eine somatische Gentherapie sind hier
aufgeführt:

- Die Therapie der cystischen Fibrose (CF): Dazu muß der
30 Keim dem zu therapierenden Patienten durch Inhalation
verabreicht werden. Bei dem Bakterium handelt es sich
vorzugsweise um einen Keim, der über Tröpfcheninfektion
übertragen wird. In dem Bakterium befindet sich das
CFTR-Gen, das den bei der CF maßgeblichen Defekt kurie-
35 ren kann. Das Bakterium dringt in die Säulenzellen des

Luftweges (airway lumen-facing columnar cells) ein und transfiziert diese mit der CFTR-DNA integriert in den TGC-Vektor. Die Zellen werden somatisch transgen, der Defekt wird kuriert.

5

- Durch somatische Gentherapie mit dem humanen β -Globulingens kann die β -Thalassaemie behandelt werden. Dazu werden ex vivo Stammzellen der haematopoetischen Reihe mit einem TGC-Sicherheitsstamm infiziert, der das β -Globulingen auf die Stammzelle überträgt. Durch Behandlung der Zellen in der Zellkultur wird das infizierende Bakterium eliminiert und die transgene Zelle für die Rückübertragung auf den Menschen vorbereitet. Diese Übertragung erfolgt durch intravenöse Gabe.

15

- Bei der Therapie des Hurler Syndroms werden primitive CD34-positive Zellen des Knochenmarks mit dem α -L-Iduronidase-Gen transfiziert. Der Weg der Gentherapie und der Rückübertragung der Zellen auf den Patienten entspricht dem im vorherigen Abschnitt beschriebenen Weg.

20

- Bei der Gentherapie der Fanconi Anaemie wird das Gen der Fanconi Anaemie Komplementationsgruppe C (FACC) zur somatischen Gentherapie eingesetzt. Zielzellen der Infektion mit der TGC-Amme sind hierbei erneut CD34-positive Zellen des Knochenmarks.

25

i) Nachweis des Erfolges des TGC-Verfahrens

30

Der DNA-Transfer wird in der Maus bereits innerhalb der ersten 24 Stunden sichtbar, d.h. lange bevor eine spezifische Immunantwort gegen das Bakterium entstanden sein konnte. Gezeigt wurde dies durch die Produktion von β -Galactosidase oder von dem fluoreszierenden Protein EGFP in Zellkulturen

35

innerhalb von 24 Stunden. Der im Rahmen der Infektion zusätzlich auftretende "mitogene Effekt der Bakterien" begünstigt die Etablierung der DNA in der TGC-Zelle und ist damit erwünscht und für den Erfolg des TGC-Verfahrens
5 vorteilhaft.

Zusammenfassend ist deshalb festzustellen, daß der Einsatz von Bakterien zur somatischen Gentherapie sicherer ist als die Gentherapie mit viralen Systemen. Die bakterielle Infektion
10 kann gerichtet und örtlich begrenzt werden. Das Wachstum und damit die floride Infektion durch die Bakterien kann durch Ausschalten bestimmter bakterieller Faktoren verhindert werden. Außerdem kann das Wachstum der Bakterien in der eukaryonten Zelle genau beeinflußt und generell verhindert
15 werden. Schließlich ist die Beendigung der bakteriellen Infektion durch den Einsatz von Antibiotika jederzeit möglich, d.h. die Infektion läßt sich örtlich, zeitlich und effektiv begrenzen.

20 Im folgenden wird am Beispiel von *L.monocytogenes* die Erfindung detailliert beschrieben:

Beispiel 1: Die Herstellung von TGC-Sicherheitsstämmen

25 Die *L.monocytogenes* Sicherheitsstämme werden durch gezielte genetische Veränderungen von primär pathogenen *L.monocytogenes* Stämmen hergestellt. Dabei werden mehrere Ebenen der Sicherheit parallel zueinander etabliert. Damit wird verhindert, daß durch Rückmutationen die Vitalität oder Pathogenität
30 wieder entstehen können. Die Mutationen betreffen Gene, die (1) das Überleben der Bakterien in der Zelle beeinflussen, (2) die die Pathogenität der Bakterien im TGC-Wirt mindern und (3) die das Überleben der Bakterien in der Umwelt nach einer möglichen Ausscheidung verhindern.

- 21 -

- a) Erste Ebene der Sicherheit - Sicherheitsrelevante Eigenschaft: Überleben in der Umwelt (siehe oben, B.1 unter Aufzählungspunkt (b))

5 Die TGC-Ammen können dem TGC-Wirt entweder durch Injektion oder durch perorale Gabe appliziert werden. Bei peroraler Gabe kann es zu einem Überangebot an Bakterien und dadurch zur Ausscheidung von Bakterien kommen, die vom Organismus nicht aufgenommen werden. Damit diese ausgeschiedenen Bakterien
10 keine Chance haben, in der Umwelt zu überleben, können die TGC-Sicherheitsstämme zusätzliche Mutationen enthalten, die das Wachstum der Bakterien in der Umwelt verhindern.

Als ein Beispiel hierfür wird das Ausschalten des cspL-Gens
15 (cold shock protein der Listerien) angeführt. Das hat zur Folge, daß die Bakterien bei Temperaturen unter 20°C nicht mehr wachsen können. Das Wachstum und die Infektionsfähigkeit bei 37°C sind nicht beeinträchtigt, werden allerdings bei gleichzeitigen Mutationen gemäß a) und b) zusätzlich modu-
20 liert. Das cspL-Gen, das in den erfindungsgemäß eingesetzten Sicherheitsstämmen deletiert ist, ist im Sequenzprotokoll als SEQ. ID No. 2 dargestellt. Ein entsprechender cspL-deletierter Stamm ist unter der Bezeichnung L.monocytogenes EGD Delta cspL1 bei der DSM unter der Nr. 11883 hinterlegt worden.

25 Die erfindungsgemäß eingesetzten TGC-Sicherheitsstämme können nur auf speziellen Wachstumsmedien angezüchtet werden. Die Wachstumstemperatur muß dabei über 37°C betragen, unter 20°C ist ein Wachstum unmöglich. Die Bakterien besitzen eine
30 eingeschränkte Pathogenität und vermögen nur noch in begrenzten, eng umschriebenen Arealen des TGC-Wirtes vorzudringen. Damit wird die Sicherheit des Systems für Mensch und Umwelt garantiert. Die TGC-Ammen sind außerhalb der artefiziellen Medien, hier speziell in der Wirtszelle, nicht mehr wachstums-
35 fähig. Diese eingeschränkte intrazelluläre Lebensfähigkeit ist

- 22 -

gleichzeitig eine Voraussetzung für die Freisetzung der TGC-DNA in der Wirtszelle und damit für die Induktion der somatischen Transgenität im TGC-Verfahren.

- 5 b) Zweite Ebene der Sicherheit - Attenuierung: verminderte Pathogenität (siehe oben, B.2 unter Aufzählungspunkt (b))

10 Die zweite Ebene der Attenuierung der TGC-Sicherheitsstämme umfaßt Mutationen in den Pathogenitätsfaktoren. Durch gezielte Mutationen in definierten Faktoren wird die Pathogenität der Bakterien abgeschwächt, die Apoptoseinduktion der infizierten Wirtszelle verhindert und gleichzeitig die Immunreaktion in eine gewünschte Richtung dirigiert. Die Mutationen schränken
15 die intrazelluläre Motilität der Bakterien und damit ihre Ausbreitung in sekundäre Zellen ein. Dadurch wird die Infektion unter Beibehaltung der Behandelbarkeit durch bekannte Antibiotika auf die ausgesuchten Zielzellen begrenzt.

20 Aus Sicherheitserwägungen ist es wünschenswert, die intrazelluläre Ausbreitung der TGC-Amme nach der Infektion einzuschränken oder gar zu verhindern. Das genaue Wissen über die intrazelluläre Lebensweise und die Motilität der oben-
25 genannten Bakterien ermöglicht es, definierte, stabile Mutanten mit verminderter Fähigkeit zur Infektion des TGC-Wirtes zu erzeugen.

Bei L.monozytogenes betreffen die in diesem Sinne attenuierten Mutationen zum Beispiel das hly-Gen mit der Folge der Blockade
30 der Infektion der ersten Zelle. Als ein Beispiel für die Ausschaltung dieses Pathogenitätsfaktors ist der Stamm L.monozytogenes EGD Hly_{D491A} hinterlegt worden und hat die Hinterlegungsnummer DSM 11881 erhalten.

Ein anderes Beispiel für die Verminderung der Pathogenität von *L.monocytogenes* sind Mutationen im *actA*-Gen oder die Deletion von Regionen, die für die Interaktion zwischen *actA* und dem Wirtszellprotein VASP erforderlich sind, mit der Folge, daß
5 die intrazelluläre Motilität blockiert ist. Schließlich gibt es auch Mutationen des *plcB*-Gen, wodurch den Bakterien die Möglichkeit genommen wird, sich in eine zweite Zelle hinein auszubreiten. Der hinterlegte Stamm *L. monocytogenes* EGD Delta *actA* Delta *plcB* ist ein Beispiel für eine doppelte Mutation,
10 in der sowohl das *actA*-Gen als auch das *plcB*-Gen ausgeschaltet sind. Er trägt die Hinterlegungsnummer DSM 11882.

Außerdem ist es auch möglich, in *L.monocytogenes* das Wildtyp-Listeriolysin-Gen gegen ein mutiertes Allel auszutauschen.
15 Dann werden die Eigenschaften des Listeriolysin, sowohl eine Apoptose in verschiedenen Wirtszellen zu induzieren als auch und eine starke T-Zellvermittelte Immunantwort zu generieren, eingeschränkt.

20 c) Überleben in der Zelle: - Endogener Suizid: 3. Ebene der Sicherheit (siehe oben, C.1 unter Aufzählungspunkt (b))

Allgemein zeichnen sich die für das TGC-Verfahren attenuierten Bakterien durch definierte Deletionen in den Genen aus, die
25 für die Biosynthese integraler bakterieller Komponenten essentiell sind. Die ausgewählten auxotrophen Bakterien eignen sich als TGC-Amme, denn als attenuierte Bakterien können sie fremde DNA in die Zelle transportieren. Da die Bakterien jedoch in den Zellen von essentiellen "Wachstumsfaktoren"
30 abgeschnitten sind, lysieren sie spontan und setzen dabei die TGC-DNA in der Zelle frei.

Als TGC-Sicherheitsstämme werden *L.monocytogenes* eingesetzt, die genetisch derart verändert sind, daß sie die Zelle zwar
35 noch infizieren, sich aber in der Zelle nicht mehr vermehren

können. Dies wird u.a. durch die Inaktivierung des *dapE*-Gens in *L.monocytogenes* erreicht. Listerien sind Gram-positive Bakterien, die ebenso wie die Gram-negative Bakterien zur Vernetzung der Zellwand meso-Diaminopimelinsäurederivate (DAP) benötigen. Die Biosynthese von Diaminopimelinsäure ist daher für die Bildung der bakteriellen Zellwand essentiell. DAP-auxotrophe Bakterien unterliegen der spontanen Lyse, wenn diese Aminosäure im Kuluturmedium nicht mehr angeboten wird. Die Enzyme, die bei der DAP-Synthese im Bakterium beteiligt sind, sind in Säugerzellen nicht vorhanden. In TGC-Sicherheitsbakterien sind eben diese Enzyme deletiert oder durch Insertionen oder auf eine andere Weise inaktiviert. Das *dapE* von *L.monocytogenes*, das in den erfindungsgemäß eingesetzten Sicherheitsstämmen inaktiviert wurde, ist im Sequenzprotokoll als SEQ. ID No. 1 dargestellt. Zur genetischen Manipulation des *dapE* Gens in *L.monocytogenes* mußte dessen Sequenz bestimmt werden, den entsprechende Gene z.B. aus *E.coli* weisen lediglich eine ca 30%ige Homologie zur Sequenz des SEQ ID No. 1 Protokoll auf.

Die dieses oder anderer Gene des DAP-Biosyntheseweges beraubten Bakterien, sog. DAP-Mutanten, können weder innerhalb noch außerhalb des Wirtes wachsen. Dazu benötigen sie den Zusatz von großen Mengen an DAP (1mM) zum Wachstumsmedium. Fehlt es an DAP, kann das Bakterium weder im TGC-Wirt noch außerhalb des TGC-Wirts überleben. Damit bieten diese DAP-Mutanten sowohl Sicherheit vor einer bakteriellen Infektion des TGC-Wirtes als auch Sicherheit vor einer Infektion anderer Organismen im Falle der Freisetzung eines derartigen Stammes in die Außenwelt.

Ein Eingriff ins Genom von Salmonellen mit entspecehnder Auswirkung (Schaffung einer auxotrophen Mutante) stellt die Deletion (oder Blockade oder Mutagenese) des *aroA* Gens dar, das zur Synthese aromatischer Aminosäuren essentiell ist. Aus

- 25 -

dem Salmonellen Impfstamm (zugänglich bei der amerikanischen Stammsammlung unter ATCC14028) läßt sich durch genetische Manipulation mit Techniken, die dem Fachmann bekannt sind, und in Kenntnis des *aroA* Gens (Genebank Annahme-Nummer M 10947) eine Mutante gewinnen, die analog den hier für Listerien beschriebenen rekombinanten Bakterien als TGC-Sicherheitsstamm fungieren kann. Die Freisetzung der Fremd-DNA erfolgt, wie für den oben beschriebenen *L.monocytogenes* delta *dapE* Stamm, durch Absterben der Bakterien nach Aufnahme in die Zelle. Anderes als *L.monocytogenes* vermögen Salmonellen nicht in das Zytoplasma der Zelle zu gelangen. Die Freisetzung der Fremd-DNA erfolgt in diesem Fall aus den Endosomen ins Zellinnere.

Es sind auch noch andere attenuierte Mutationen von *L.monocytogenes* bekannt, in denen die Biosynthese von Nukleinsäuren, Aminosäuren, Zuckern oder anderen Zellwandbausteinen blockiert ist [33 bis 35]. Gleiches kann auch durch Mutationen in regulatorischen Genen erreicht werden, die für den intrazellulären Lebensstil der Bakterien essentiell sind. Beispielfür ein derartiges Gen ist *phoP* von *Salmonella typhimurium* [36].

Die hier aufgeführten Beispiele für *L.monocytogenes* sind auf andere intrazellulär vitale Bakterien oder Bakterien übertragbar, die erst durch Aufrüstung mit Pathogenitätsfaktoren zu intrazellulären Erregern gemacht werden. Dies gilt insbesondere für Bakterien der Gattungen *Aeromonas*, *Bartonella*, *Brucella*, *Campylobacter*, *Clostridia*, *Enterobacteriaceae* (besonders *E.coli*, Salmonellen, Shigellen, Yersinien), *Mycobacterium*, *Renibacterium* und *Rhodococcus*. Ein in diesem Sinn auferüsteter TGC-Sicherheitsstamm ist zum Beispiel *Bacillus subtilis*, der zusätzlich mit dem Listeriolysin aus *L.monocytogenes* ausgerüstet ist.

Eine wichtige Voraussetzung für die Übertragung von DNA selbst in "abgelegene" Körperzellen ist der Schutz der DNA auf dem Weg bis zur Zielzelle oder dem Zielgewebe oder dem Zielorgan. Die Fähigkeit intrazellulär vitaler Bakterien wie *L.monocytogenes* zur intrazellulären Ausbreitung ist eine ideale Eigenschaft, Gene in abgelegene Zellen, in tiefere Gewebe und Organe zu transportieren. Nach erfolgreichem Transfer der TGC-DNA in die Zielzelle verstirbt der Bote, die TGC-Amme, in Folge der Attenuierung (B.1), der Induktion von Auxotropien (B.2), des endogenen Suizids (C.1), der Infektion über Endosomen (C.2), der Infektion über Phagolysosomen (C.3), des exogenen Suizids (C.4) oder der Antibiotikatherapie (D.1).

Beispiel 2: Freisetzung der Fremd-DNA in der animalen Zelle (synonym: Gewebe; Organ)

a) Infektion über Endosomen: Transfer des Expressionsplasmids ohne Befreiung der Bakterien aus dem Endosomvesikel (siehe oben, C.2 unter Aufzählungspunkt (b))

Es wurde getestet, ob Bakterien in der Lage sind, ihre Plasmid-DNA ins Zytoplasma infizierter Wirtszellen zu übertragen, ohne daß sie sich vorher aus dem Endosomvesikel befreit haben müssen. Dazu wurde die Fähigkeit der *L. monocytogenes* Dhly Mutante, die nicht mehr aus dem Endosom austreten kann, untersucht, als übertragendes Bakterium für den DNA-Transfer zu fungieren. Als zu übertragende Fremd-DNA wurde EGFP gewählt, ein fluoreszierendes Protein, das unter der Kontrolle eines CMV-Promotors kloniert war. Als Maß für die erfolgreiche Übertragung der Fremd-DNA - d.h. als Maß für die Transfektion der eukaryonten Zelle - wurden 10.000 Zellen im FACS-Scanner nach Infektion mit den jeweiligen *L.monocytogenes* Stämmen auf das Vorkommen der EGFP-ausgelösten Fluoreszenz untersucht. Die Anzahl ist in Tabelle 1 in % der Gesamtzahl der gemessenen eukaryonten Zellen ausgedrückt. Bei

- 27 -

den Experimenten diene der *L. monocytogenes* Wildtyp-Stamm EGD als positiv Kontrolle. Geprüft wurde auch eine isogener, nicht invasiver Δ InlAB Stamm. Die Aussagen, die mit diesen Bakterien gewonnen wurden, haben Allgemeingültigkeit und sind auf andere Bakterien übertragbar.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengefaßt und zeigen, daß die Dhly Mutante in Bezug auf den DNA-Transfer vom Bakterium in die eukaryonte Zelle genauso effizient ist, wie der *L. monocytogenes* Wildtyp-Stamm. Der *L. monocytogenes* Δ InlAB Stamm ist als Vehikel für DNA-Transfer in die hier angegebenen Zellen nicht (PtK2) oder aber wesentlich schlechter (Hep-2) geeignet. Die Experimente zeigen weiterhin, daß die aktive Aufnahme der Bakterien durch die eukaryonte Zelle (in diesem Fall keine professionellen Phagozyten) die Voraussetzung für die Transfektion der Zellen ist. Die Anheftung der Bakterien wird durch die Interaktion zwischen bakteriellen Internalinen (InlA und/oder InlB) und den Rezeptoren der animalen Zellen bewirkt. Die Experimente des folgenden Beispiels zeigen, daß Internaline zur Aufnahme von Bakterien in professionelle Phagozyten nicht notwendig sind.

Zell- linie	Ursprung	<i>L. monocytogenes</i> - Stamm	Transfizierte Zellen in %
PtK2	Kangaroo rat kidney	Wildtyp EGD	1.71
		Δ hly	1.78
		Δ inlAB	0
Hep-2	human larynx carcinoma	Wildtyp EGD	4.58
		Δ hly	4.31
		Δ inlAB	0.24

b) Infektion über Phagolysosomen: Aufrüstung nicht pathogener Stämme zum TGC-Sicherheitsstamm: (siehe oben, C.3 unter Aufzählungspunkt (b))

Das im folgenden für *L. innocua* dargestellte Beispiel ist exemplarisch und kann auf andere nicht pathogene Bakterien (z.B. *Escherichia coli*) übertragen werden. Die auszuführenden Eingriffe in die genetische Ausstattung solcher Bakterien entsprechen den hier für *L. innocua* angeführten.

Ein nicht pathogener *L. innocua* Stamm (Sero var 6a) wurde mit dem Pathogenitätsfaktoren Listeriolysin und ActA aus *Listeria monocytogenes* "aufgerüstet". Um die Expression dieser Gene regulieren zu können, wurde als drittes Gen der in trans positiv-wirkende Transkriptionsfaktor (PrfA) in den gentechnisch manipulierten *L. innocua* Stamm einkloniert. Die Gegenwart von PrfA macht die Expression der Virulengene von der Wachstumstemperatur abhängig. Da dieser rekombinante *L. innocua* Stamm keine Internaline besitzt, d.h. von sich aus nicht invasiv ist, kann er nicht in die oben erwähnten Zellen (Ptk2; Hep-2) eindringen. Wünscht der Experimentator zusätzlich auch solche Zelle infizieren zu können, so müssen die Bakterien zusätzlich mit den Internalinen InlA und/oder InlB ausgestattet werden. Die Experimente des vorliegenden Beispiels zeigen, daß es zur Aufnahme des *L. innocua* (hly+; actA+) Stammes durch professionelle Phagozyten dieser bakteriellen Produkte (Internaline) nicht bedarf. Nach ihrer Phagozytose setzt der *L. innocua* Stamm (hly+; actA+) das Eiweiß Listeriolysin zur Lyse der Phagolysosomen der professionellen Phagozyten ein. Im elektronenmikroskopischen Bild ist zu erkennen, daß der genetisch manipulierte *L. innocua* (hly+; actA+) Stamm im Zytoplasma der professionellen Phagozyten auftaucht. Der Wildtypstamm *L. innocua* Sero var 6a hingegen wird im Phagolysosom abgetötet und erscheint nicht im Zellzytoplasma. Die Expression des ActA-Proteins erlaubt dem *L. innocua* (hly+; actA+) Stamm eine Aktin-Zytoskelett abhängige intrazelluläre Bewegungen, die im EM-Bild der Bewegung der *L. monocytogenes* Stämme ähnlich sieht. Auf Grund des Fehlens weiterer Gene, wie z.B. des plcB Gens, kann sich der hier

erwähnte *L. innocua* (*hly+*; *actA+*) Stamm nicht auf Nachbarzellen ausbreiten. Diese spezifische Änderung in der Infektiosität wurde bereits für rekombinante *L. monocytogenes* *ΔplcB* Stämme beschrieben.

5

Die gezielte Auswahl von Genen, hier *hly* und *actA*, und deren Transformation in nicht pathogene Bakterien, überträgt die ausgewählten *L. monocytogenes* Eigenschaften auf nicht pathogene Bakterien. Die Befreiung der Bakterien aus dem "tödlichen"

10 Phagolysosom ist die Voraussetzung für den Transfer fremder DNA in die infizierten Zellen. Die zur Umprogrammierung der animalen Zelle zu übertragende DNA wird dabei in Konstrukte integriert, wie sie oben bereits für attenuierte *L. monocytogenes* Bakterien - die bereits als solche erfindungsgemäß

15 eingesetzt werden können - beschrieben wurden. Die Freisetzung der genetischen Information erfolgt erfindungsgemäß durch (i) Schaffung auxogener Mutanten (Deletion endogener, lebensnotwendiger Gene), durch (ii) Einführung von "Suicid-Genen", (iii) durch induzierte Aufnahme in Endosomen und Abtötung

20 darin oder (iv) durch eine zeitlich definierte und auf die Abtötung der Bakterien in einem Zielorgan oder Gewebe bezogene Antibiotikatherapie.

Die Experimente dieses Beispiels zeigen exemplarisch, wie von

25 Hause aus nicht pathogene Bakterien sukzessiv "aufgerüstet" werden können. Durch Ausrüstung mit definierten bakteriellen Faktoren (hier Gen d.h. Eigenschaften natürlich invasiver Bakterien) lassen sich ansonsten für das TGC-Verfahren primär ungeeignete Bakterien, von Experimentator derart manipulieren

30 und steuern, daß sie für eine kontrollierte Infektion und Übertragung von DNA in die animale Zelle (synonym: Gewebe, Organ, Ganztier, Mensch) eingesetzt werden können.

c) Freisetzung durch exogenen Suizid: Einklonierung von

35 Suizidgenen: (siehe oben, C.4 unter Aufzählungspunkt (b))

- 30 -

- Suizid-Gene, die nach dem Eindringen in die Wirtszelle aktiviert werden und zum Absterben der Bakterien führen, können den Bakterien in Form von Lysisgenen aus Bakteriophagen, zum Beispiel mit dem S-Gen des Bakteriophagen Lambda oder
- 5 Analoga [37], oder mit Killergen aus Plasmiden [38] zugeführt werden. Diese Gene stehen unter der Kontrolle eines intrazellulär induzierbaren Promotors (zum Beispiel pagC-Promotor aus Salmonella [38]).
- 10 d) Freisetzung durch Antibiotikatherapie: Gezielte Freisetzung von Fremd-DNA in der Lunge nach Tröpfchen-Infektion von Listeria monocytogenes (siehe oben, D.1 unter Aufzählungspunkt (b))
- 15 Die Infektion mit den Bakterien erfolgte nach dem Verfahren der "Body plethysmography in spontaneously breathing mice" gemäß R. Vijayaraghavan [Arch. Toxicol. 67: 478-490 (1993)]. Bei dem Versuch wurden die Mäuse einzeln in einer Inhalations-
- 20 kammer für eine halbe Stunde einem Aerosol von einem Milliliter Bakteriensuspension ausgesetzt, das insgesamt 5000 Bakterien enthielt. Diese Anzahl von Bakterien entspricht einer LD50 Dosis bei intraperitonealer Gabe der Bakterien. Um den Verlauf der Infektion in Echtzeit verfolgen zu können, wurden die Bakterien erneut mit einem EGFP-Genkonstrukt
- 25 transformiert. Durch Fluoreszenzanalyse des im Gewebe gebildeten EGFP-Proteins wurde der Weg der Bakterien im Tiermodell verfolgt. Demnach dringen die Bakterien innerhalb einer halben Stunde in die Säulen- und Endothel-Zellen des Luftweges ein. Zu diesem Zeitpunkt sind keine Bakterien in
- 30 anderem Gewebe bzw. Organen des infizierten Tiers, wie z.B. Milz, Leber, Gehirn, zu finden. Die Infektion bleibt für bis zu 18 Stunden ausschließlich auf die Lunge begrenzt. Erst nach 24h werden auch andere Organen befallen.

Der Versuch zeigt, daß die Ausbreitung der Bakterien nach Tröpfcheninfektion auf das Primärorgan begrenzt werden kann, wenn in deren Lebensfähigkeit eingegriffen wird. Zwei Wege, dies zu erreichen, sind die Verwendung attenuierter Mutanten (z.B. deletiert im "Ausbreitungsgen" ActA) und/oder die Zerstörung der Bakterien durch Antibiotika-Therapie Zugabe zu einem vom Experimentator vorgegebenen Zeitpunkt, d.h. in einem vom Experimentator vorgegebenen Organ.

10 **Beispiel 3: Beschreibung der TGC-Vektoren**

TGC-Vektoren sind episomale DNA, zum Beispiel Plasmide mit geringer Aufnahmefähigkeit von Fremd-DNA (pMB-Abkömmlinge, die für einzelne Gene ausreicht), oder mit größerer DNA-Aufnahmefähigkeit (wie bei Pl- oder F-Plasmiden), um die somatische Transgenität für komplexe Biosynthese-Wege zu schaffen.

In allen Fällen handelt es sich um Plasmide, die in den zur genetischen Veränderung und zur Anzucht für das TGC-Verfahren eingesetzten Bakterien Wirten repliziert werden. Als Beispiel für einen Zwischenwirt, in dem genetische Bausteine konstruiert werden können, eignen sich E.coli oder andere in der rekombinanten DNA-Technologie üblicherweise eingesetzte Bakterien. Als TGC-Sicherheitsstamm eignet sich unter anderem L.monocytogenes oder die anderen obengenannten Bakterien, die als TGC-Amme fungieren. Um diese Bedingung zu erfüllen, enthalten die Plasmide die wirtsspezifischen Plasmid-Replikon-Sequenzen. Bei der Erzeugung der rekombinanten DNA müssen transformierte von "nackten" Wirtszellen unterschieden werden. Als Selektionsprinzipien können dabei die gängigen Antibiotikaresistenzgene eingesetzt werden.

- 32 -

Beispiel 4: Transformation von L.monocytogenes-Sicherheitsstämmen zu TGC-Ammen

Die Transformation von L.monocytogenes erfolgt nach einem
5 modifizierten Protokoll von Park und Stewart [40].

Dazu werden Bakterien bis zu einer optischen Dichte von OD_{600}
= 0,2 angezogen. Dem Anzuchtsmedium wird Ampicillin ($10\mu\text{g/ml}$)
und 1 mM Glyzin zugegeben. Es erfolgt dann eine weitere
10 Vermehrung bis zu einer OD_{600} von 0,8 bis 1,0. Die Zellen
werden durch Abzentrifugation geerntet und in 1/250 Vol.
kaltem Elektroporationspuffer (1 mM Hepes, pH 7,10; 0,5 M
Sucrose) aufgenommen. Als Vorbereitung zur Elektroporation
werden die Bakterien bis zu viermal gewaschen.

15

Zur Elektroporation werden 50 μl der vorbereiteten Zellen in
eine Elektroporationsküvette gegeben, die Elektroporation
erfolgt bei 10 kV/cm, 400 Ohm, 25 μF unter Einsatz von ca 1 μg
DNA.

20

Danach kommen die Zellen sofort auf Eis und werden in 10-
fachem BHI-Medium aufgenommen und für 2 Stunden bei 37°C unter
vorsichtigem Schütteln bebrütet. Nach dieser Zeit werden die
Zellen ausplattiert und bei der gewünschten Temperatur
25 bebrütet. Die Effizienz der Transformation nach dieser Methode
beträgt 10^4 bis 10^5 Transformaten pro μg eingesetzter Plasmid
DNA.

Beispiel 5: Beschreibung der Anzucht von TGC-Ammen zum
30 **Einsatz im TGC-Verfahren**

Listerien wurden bevorzugt in der Brain-Heart-Infusion Broth
zum Beispiel BHI der Firma Difco angezüchtet. Alternativ und
für spezielle Anwendungen (radioaktive Markierung listerieller
35 Proteine) können die Bakterien in Tryptic Soy broth (TSB) oder

in Listerien Minimal Medium (LMM) gezüchtet werden [36]. Die Bakterien werden abzentrifugiert und mehrfach im geeigneten Transfer-Medium, zum Beispiel einem Bicarbonat-haltigen Puffer, gewaschen.

5

Derart vorbereitete Bakterien können unter Zusatz von 15% Glycerin Lösung bei -80°C für mindestens 6 Monate aufbewahrt werden, bevor sie in das TGC-Verfahren eingesetzt werden.

10 **Beispiel 6: TGC-Verfahren - Verfüttern der TGC-Ammen**

Zur Einleitung des TGC-Verfahrens wird den Tieren für einige Stunden das Trinkwasser entzogen. Die (TGC-Ammen: TGC-DNA im gewünschten TGC-Stamm) werden in einem Bicarbonat-haltigen
15 Puffer geeigneter Konzentration aufgenommen und den Tieren oral, durch Inhalation oder per Injektion (parenteral, intramuskulär, intraperitoneal oder direkt in das gewünschte Zielorgan) verabreicht. Die Art der Applikation richtet sich nach dem physiologischen Infektionsweg der entsprechenden TGC-
20 Amme. Die Auswahl des Keimes der als TGC-Sicherheitsstamm eingesetzt wird, richtet sich nach Zielorgan und wird entsprechend des Infektionsweges und entsprechend des Organotropismus des jeweiligen Bakteriums festgesetzt. Die Dosis an Bakterien wird so gewählt, daß die gewünschte
25 organotrope Einschleusung der TGC-Amme erzielt wird. Die Menge und die Art der Applikation der Bakterien richtet sich dabei nach dem jeweiligen Bakterium, ist aber auch vom Wirt und dem Zielorgan abhängig (siehe auch Beispiel 2).

30 **Beispiel 7: Durchführung der somatischen Gentherapie**

Als Beispiele für eine somatische Gentherapie sind hier aufgeführt:

- 34 -

- Die Therapie der cystischen Fibrose (CF): Dazu muß der Keim dem zu therapierenden Patienten durch Inhalation verabreicht werden. Bei dem Bakterium handelt es sich vorzugsweise um einen Keim, der über Tröpfcheninfektion übertragen wird. In dem Bakterium befindet sich das CFTR-Gen, das den bei der CF maßgeblichen Defekt kurieren kann. Das Bakterium dringt in die Säulenzellen des Luftweges (airway lumen-facing columnar cells) ein und transfiziert diese mit der CFTR-DNA integriert in den TGC-Vektor. Die Zellen werden somatisch transgen, der Defekt wird kuriert.
- Durch somatische Gentherapie mit dem humanen β -Globulingen kann die β -Thalasaemie behandelt werden. Dazu werden ex vivo Stammzellen der haematopoetischen Reihe mit einem TGC-Sicherheitsstamm infiziert, der das β -Globulingen auf die Stammzelle überträgt. Durch Behandlung der Zellen in der Zellkultur wird das infizierende Bakterium eliminiert und die transgene Zelle für die Rückübertragung auf den Menschen vorbereitet. Diese Übertragung erfolgt durch intravenöse Gabe.
- Bei der Therapie des Hurler Syndroms werden primitive CD34-positive Zellen des Knochenmarks mit dem α -L-Iduronidase-Gen transfiziert. Der Weg der Gentherapie und der Rückübertragung der Zellen auf den Patienten entspricht dem im vorherigen Punkt.
- Bei der Gentherapie der Fanconi Anaemie wird das Gen der Fanconi Anaemie Komplementationsgruppe C (FACC) zur somatischen Gentherapie eingesetzt. Zielzellen der Infektion mit der TGC-Amme sind hierbei erneut CD34-positive Zellen des Knochenmarks.

Beispiel 8: Kontrolle für den Erfolg der induzierten somatischen Transgenität

Nach dem Transfer der TGC-DNA in den TGC-Wirt ist der Erfolg
5 des TGC-Verfahrens nachzuweisen. Dazu eignen sich immunologi-
sche Nachweise des Genproduktes (Proteins) durch Immunoassays
wie den ELISA, den Immunoblot oder andere bekannte Nachweise,
die auf einer Antigen-Antikörperreaktion beruhen. T-Zell-
Antworten können in speziellen Assays abgerufen werden und
10 werden immer dann angewendet, wenn es sich bei dem Antigen um
eine Substanz handelt, die über MHC-Klasse I vermittelte
Immunantworten erkannt wird.

Handelt es sich bei dem produzierten Protein um ein Enzym,
15 so kann dessen biologische Aktivität in Form der enzymatischen
Aktivitätstestung erfolgen. Besitzt das Protein zusätzlich
eine biologische Aktivität, so wird die Leistungsfähigkeit des
gebildeten Proteins durch biologische Assays abgerufen.

20 Für Proteine, die eine passive oder aktive Immunisierung des
TGC-Wirtes induzieren, wird die Protektion gegenüber dem
auslösenden Agens getestet. Es kann sich zum Beispiel um die
Verhinderung der Besiedlung, der Infektion (oder der apparen-
ten Erkrankung) des Versuchstieres nach Belastung mit dem
25 pathogenen Organismus (Bakterium oder Virus) handeln.

Beispiel 9: Ernte des Proteins

Die Gewinnung des produzierten Proteins erfolgt durch
30 Techniken, die jeder in der Landwirtschaft tätigen Person
bekannt sind:

- ist der TGC-Wirt eine Kuh oder ein anderes laktierendes
Nutztier und das Euter das infizierte Organ, so werden
35 die bekannten Techniken des Melkens eingesetzt;

- 36 -

- wenn Geflügel Tiere wie Hühner als TGC-Wirt eingesetzt wurden, so werden die Eier gesammelt und der Protein-Reinigung zugeführt;
- 5 - die Aufarbeitung von Proteinen aus Organen, deren Produkte nicht nach außen abgegeben werden, erfolgt durch die Gewinnung des entsprechenden Organs, wozu in der Regel eine Schlachtung nötig sein wird, zum Beispiel bei Fischen;
- 10 - ist das Blut das somatisch transgene Gewebe, so wird das gewünschte Produkt nach Venenpunktion aus dem Blut oder seinen Zellen gewonnen und mit dem Fachmann bekannten Methoden aufgereinigt.

15

Beispiel 10: Anreinigung des Proteins

Eine Vorreinigung des zu produzierenden Proteins erfolgt durch Trennungungsverfahren, die sich primär physikalischer oder physikochemischer, dem Fachmann wohl bekannter Methoden bedienen. Dazu gehören Fällungen der Proteine mit Salzen (zum Beispiel Ammoniumsulfat), mit Säuren (zum Beispiel Trichlor-essigsäure) oder unter Einwirkung von Hitze oder Kälte.

25 Eine grobe Trennung wird auch mittels der Säulenchromatographie erreicht. Alle hier eingesetzten Verfahren richten sich sehr stark nach den primären Medien, in denen sich das jeweilige Protein anreichert. So sind zum Beispiel für die Aufarbeitung von Milch oder Eiern in der Industrie viele Methoden bekannt, die auch auf die hier geschilderte Erfindung anwendbar sind. Gleiches gilt für die Aufarbeitung von Blut als somatisch-transgenes Gewebe. Hier kann auf die Erfahrungen auf die Transfusionsmedizin, spezielle auf die Aufarbeitung und Reinigung von Blutgerinnungsfaktoren zurückgegriffen werden.

35

Beispiel 11: Reinigung des Proteins

Zur endgültigen Reinigung der Proteine sind alle Methoden einsetzbar, die für konventionelle Reinigungen von Proteinen Anwendung finden. Dazu gehören

- die Reinigung mittels Affinitätschromatographie zum Beispiel unter Ausnutzung der Rezeptor-Ligand Interaktion;
- die Darstellung von Fusionsproteinen mit sog. "Tags", die zur spezifischen Interaktion mit einer Matrix der Chromatographie eingesetzt werden können (zum Beispiel Poly-Histidin-Tag und Nickel-Säulen-Chromatographie; die Streptavidin-Biotin Technologie der Affinitätsreinigung). Die Tags können bei fachgerechter Einführung einer entsprechenden Proteaseschnittstelle durch späteren Proteasen-Verdau wieder entfernt werden;
- die Reinigung mittels spezifischer Antikörper (Immunitätschromatographie);
- die Ausnutzung natürlicher Affinitäten zwischen dem Zielprotein und anderen Proteinen, Kohlehydraten oder anderen Bindungspartnern wie im Fall des Toxin A von Clostridium difficile, dessen Bindungsfähigkeit an Thyroglobin bei 4°C und dessen anschließender Elution durch Temperaturerhöhung auf 37°C.

Beispiel 12: Produktion von TGC-Proteinen:

Die Liste der durch das TGC-Verfahren herstellbaren Proteine ist theoretisch unbegrenzt und umfaßt vor allem den Bereich der Hormone, Regulationsfaktoren, Enzyme, Enzyminhibitoren, humane monoklonale Antikörper sowie die Herstellung von

Oberflächenproteinen pathogener Mikroorganismen oder viraler Hüllproteine zur ungefährlichen Herstellung diagnostischer Tests und verträglicher Impfstoffe. Es handelt sich dabei sowohl um Massenartikel wie humanes Serumalbumin als auch um
5 Proteine, die in geringen Mengen eingesetzt werden wie Hirudin, Blutgerinnungsfaktoren, Antigene zur Tumorphylaxe und zur aktiven Immunisierung (zum Beispiel Papilloma-Antigen) sowie um Antikörper zur passiven Immunisierung.

Literaturverzeichnis:

- 5 1. Cossart P. und B.B. Finlay "Exploitation of mammalian host cell functions by bacterial pathogens Science 276: 718-725.
2. Falkow, S., Isberg, R.R. und Portnoy D.A. (1992) The
10 interaction of bacteria with mammalian cells Ann. Rev. Cell Biol. 8:333-63.
3. Weinberg, A.N. Zoonoses S. 291-2795; In Principle and
Practice of Infectious Diseases, Eds. Mandell, Douglas und
15 Bennett, J.E. und Dolin R. Churchill Livingstone New York, 1995.
4. Farber J.M. und Peterkin, P.J. (1991) *Listeria monocytogenes* - a foodborne pathogen Microbiol. Rev. 55: 476-511.
20
5. Thoen C.O. (1994) Tuberculosis in wild and domestic animals pp. 157-62, in Tuberculosis: Pathogenesis, Protection and Control ; ASM, Washington DC 20005.
- 25 6. von Hase, U., Pulz, M., Windorfer, A: EHEC in Niedersachsen, Januar 1995 - August 1997. Niedersächs. Ärztebl (1997) 20-23 u 38-40.
7. Swaminathan B., Rocourt J., und Bille J.. (1995)
30 *Listeria*. In: Manual of Clinical Microbiology. Eds: Murray, P.R., Baron E.J., Tenover F.C., und Tenover R.H. S.341-348. ASM-Press Washington DC.
8. Hof, H., Nichterlein, T. und Kretschmar, M. (1997)
35 Management of Listeriosis. Clin. Microbiol. Rev. 10: 345-357.

- 8a. Simon, C. und Stille, W. Antibiotikatherapie, Schattauer-
erverlag,
9. Chakraborty, T. und Wehland, J (1997) The host cell
5 infected with *Listeria monocytogenes* pp. 271-290; in Host
response to intracellular pathogens, Ed. S.H.E. Kaufmann R.G.
Landes co., Austin, USA.
10. Gaillard, J.L., Berche, P., Frehel, C., Gouin, E. und
Cossart, P. (1991) Entry of *L. monocytogenes* is mediated by
internalin, a repeat protein reminiscent of surface antigens
from gram-positive cocci Cell: 65; 1127-1141.
11. Lingnau, A., Domann, E., Hudel, M., Bock, M., Nicht-
15 erlein, T., Wehland, J. und T. Chakraborty (1995) Expression
of *inlA* and *inlB* in *L. monocytogenes* EGD, whose products
mediate bacterial entry into tissue culture cell lines, by
PrfA-dependent and - independent mechanisms Infect. Immun. 63:
3896-3903.
- 20 12. Alvarez-Dominguez, C., Carasco-Martin, E. und
Levy-Cobian F (1993) Role of complement component C3 in
phagocytosis of *L. monocytogenes* by murine macrophage-like
cell lines . Infect. Immun. 61: 3664-3672.
- 25 13. Dunne, D.W., Resnick, D., Greenberg, J., Krieger, M. und
Joiner, K.A. (1994) The type I macrophage scavenger receptor
binds to Gram-positive bacteria and recognizes lipoteichoic
acid. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 1863-7.
- 30 14. Gaillard, J-L, Berche, P. und Sansonetti, PJ (1986)
Transposon mutagenesis as a tool to study the role of
hemolysin in virulence of *Listeria monocytogenes* Infect.
Immun. 52: 50-55.
- 35

15. Theriot, J.A., Rosenblatt, J., Portnoy, D.A., Goldschmidt-Clermont, P.J. und Mitchison, T.J. (1994) Involvement of profilin in the actin-based motility of *Listeria monocytogenes* in cells and cell-free extracts. *Cell* 76: 505-517.
- 5
16. Chakraborty, T., Ebel, F., Domann, E., Niebuhr, K., Gerstel, B., Pistor, S., Temm-Grove, CJ, Jockusch, BM., Reinhard, M., Walter, U. und Wehland, J. (1995) A focal adhesion factor directly linking intracellularly motile
- 10 *Listeria monocytogenes* and *Listeria ivanovii* to the actin-based cytoskeleton of mammalian cells *EMBO J.* 14: 1314-21.
17. Vazquez-Boland, J.A., Kocks, C., Dramsi, S., Ohayon, H., Goeffroy, C., Mengaud, J. und Cossart, P. (1992) Nucleotide
- 15 sequence of the lecithinase operon of *L. monocytogenes* and possible role of lecithinase in cell-to-cell spread. *Infect. Immun.* 60: 219-30.
18. L'Hopital, S.J., Marly, J., Pardon, P. und Berche, P.
- 20 (1993) Kinetics of antibody production against listeriolysin O in sheep with listeriosis. *J Clin. Microbiol.* 31: 1537-40.
19. Domann, E., Zechel, S., Lingnau, A., Hain, T., Darji, A., Nichterlein, T., Wehland, J. und Chakraborty, T. (1997)
- 25 Identification and characterization of a novel PrfA-regulated gene in *Listeria monocytogenes* whose product, IrpA, is highly homologous to internalin proteins, which contain leucine-rich repeats. *Infect. Immun.* 65: 101-9.
- 30 20. Grenningloh, R., Darji, A., Wehland, J., Chakraborty, T. und Weiss, S. (1997). Listeriolysin and IrpA are major protein targets of the human humoral response against *Listeria monocytogenes*. *Infect. Immun.* 65: 3976-3980, 1997.

21. Shen, H., Slifka, M.K., Matloubian, M., Jensen, E.R.,
Ahmed, R. und Miller, J.F. (1995) Recombinant *Listeria*
monocytogenes as a live vaccine vehicle for the induction of
protective anti-viral cell-mediated immunity. Proc. Natl.
5 Acad. Sci. USA. 92: 3987-91.
22. Slifka, M.K., Shen, H., Matloubian, M., Jensen, E. R.,
Miller, J.F. und Ahmed, R. (1996) Antiviral cytotoxic T-cell
memory by vaccination with recombinant *Listeria monocytogenes*.
10 J. Virology 70: 2902-10.
23. Jensen, E.R., Selvakumar, R., Shen, H., Ahmed, R.,
Wettstein, F.O. und Miller J.F. (1997) Recombinant *Listeria*
monocytogenes Vaccination Eliminates Papillomavirus-Induced
15 Tumors and Prevents Papilloma Formation from Viral DNA. J.
Virol. 71: 8467-8474.
24. Schafer, R., Portnoy, D.A., Brassell, S.A. und Paterson,
Y. (1992). Induction of a cellular immune response to a
20 foreign antigen by a recombinant *Listeria monocytogenes*
vaccine. J. Immunol. 149: 53-9.
25. Ikonmidis, G., Paterson, Y., Kos, F.J. und Portnoy, D.A.
(1994). Delivery of a viral antigen to the class I processing
25 and presentation pathway by *Listeria monocytogenes*. J. Exp.
Med. 180: 2209-18.
26. Frankel, F.R., Hegde S., Lieberman, J. und Pateroso, Y.
(1995) Induction of cell-mediated immune responses to human
30 immunodeficiency virus type 1 Gag protein by using *Listeria*
monocytogenes as a live vaccine vector. J. Immunol. 155:
4775-82.
27. Pan, Z.K., Ikonmidis, G., Lazenby, A., Pardoll, D. und
35 Paterson, Y. (1995) A recombinant *Listeria monocytogenes*

vaccine expressing a model tumour antigen protects mice against lethal tumour cell challenge and causes regression of established tumours. *Nature Med.* 1: 471-7.

- 5 28. Dramsi, S., Kocks, C., Forestier, C. und Cossart, P. (1993) Internalin-mediated invasion of epithelial cells by *L. monocytogenes* is regulated by bacterial growth, temperature and the pleiotropic activator, *prfA*. *Mol. Microbiol.* 9: 931-41.
- 10 29. Alvarez-Dominguez, C., Vazquez-Boland, J.A., Carrasco-Marin, E., Lopez-Mato, P. und Leyva-Cobian F. (1997). Host cell heparan sulfate proteoglycans mediate attachment and entry of *Listeria monocytogenes*, and the listerial surface protein ActA is involved in heparan sulfate receptor recognition. *Infect. Immun.* 65: 78-88.
- 15 30. Domann, E., Wehland, J., Rohde, M., Pistor, S., Hartl, M., Goebel, W., Leimeister-Wächter, M., Wuenscher, M. und Chakraborty, T. (1992) A novel bacterial virulence gene in *L. monocytogenes* required for host microfilament interaction with homology to the proline rich region of vinculin. *EMBO. J.* 11: 1981-1990.
- 20 31. Kocks, C., Gouin, E., Tabouret, M., Berche, P., Ohayon, M. und Cossart, P. (1992) *Listeria monocytogenes* induced actin assembly requires the *actA* gene product, a surface protein. *Cell* 68: 521-31.
- 25 32. Armstrong, D. *Listeria monocytogenes* (1995) In *Principle and Practice of Infectious Diseases*, Eds. Mandell, Douglas und Bennett, J.E. und Dolin R.. S.1880-1885. Churchill Livingstone New York, 1995.
- 30 32a. Boucher, R.C. (1996). Current status of CF gene therapy. *Trends in Genetics* 12: 81-84.
- 35

- 44 -

- 32b. Bank A. (1996). Human somatic cell gene therapy. *BioEssays* 18: 999-1007.
33. O'Callaghan D, Maskell D, Tite J, Dougan G (1990). Immune
5 responses in BALB/c mice following immunization with aromatic
compound or purine-dependent *Salmonella typhimurium* strains.
Immunology 69:184-189.
34. Tacket, C.O., Sztein, M.B., Losonsky, G.A., Wasserman,
10 S:S., Nataro, J.P., Edelman, R., Pickard, D., Dougan, G.,
Chatfield, S., und Levine, M.M. (1997). Safety of Live Oral
Salmonella typhi Vaccine Strains with deletions in *htrA* and
aroC, *aroD* and immune response in humans. *Infect. Immun.* 65:
452-456.
- 15 35. Curtiss III, R. (1989) Attenuated *Salmonella* strains as
live vectors for the expression of foreign antigens. In *New
generation vaccines: The molecular approach* (ed. M.M. Levine
und G. Woodrow) p. 161. Marcel Dekker, New York.
- 20 36. Hopkins, S., Kraehenbuhl, J.-P., Schödel, F., Potts, A,
Peterson, D., De Grandi, P., und Nardeli-Haeffliger, D. (1995).
A recombinant *Salmonella typhimurium* vaccine induces local
immunity by four different routes of immunization. *Infect.*
25 *Immun.* 63: 3279-3286.
37. Berkmen, M., Benedik, MJ., und Blasi, U. (1997). The
Serratia marcescens NucE protein functions as a holin in
Escherichia coli. *J. Bacteriol.* 179: 6522-6524.
- 30 38. Diaz, E., Munthali, M., de Lorenzo, V., und Timmis KN
(1994). Universal barrier to lateral spread of specific genes
among microorganisms. *Mol. Microbiol.* 13: 855-861.

39. Hohmann, El., Oletta, CA., Loomis, WP, und Miller, SI (1995). Macrophage-inducible expression of a model antigen in *Salmonella typhimurium* enhances immunogenicity. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 92:2904-2908.
- 5
40. Park S.F. und Stewart G.S. (1990). High-efficiency transformation of *Listeria monocytogenes* by electroporation of penicillin-treated cells. Gene 94:129-132.
- 10
41. Premaratne, R.J., Lin, W.J. und Johnson E.A. (1991) Development of an improved chemically defined minimal medium for *L. monocytogenes*. Appl. Environ. Microbiol. 57: 3046-48.

Patentansprüche:

- 5 1. TGC-Verfahren zur Induktion einer zielgerichteten, somatischen Transgenität in einem animalen Wirt, **dadurch gekennzeichnet**, daß Bakterien mit einer in einen episomalen Vektor integrierten, unter der Kontrolle eukaryonter, regulatorischer Elemente zur späteren Transkription und
10 Expression stehender Fremd DNA bei der Infektion eines ganzen Organismus im Wirt die Fremd-Gene freisetzen und damit dort die Transkription und Expression von Fremd DNA und/oder Fremd-Protein bewirken.
- 15 2. TGC-Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Bakterien bei der Infektion eines Organs durch gezielte Perfusion oder in Kultur Fremdgene freisetzen und damit die Transkription und Expression von Fremd-Nukleinsäure und/oder Fremd-Protein im Organ bewirken.
- 20 3. TGC-Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Bakterien bei der Infektion eines animalen Gewebes Fremd-Gene freisetzen und damit die Transkription und Expression von Fremd-Nukleinsäure und/oder Fremd-Protein im
25 Gewebe bewirken.
4. TGC-Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Bakterien bei der Infektion eines Gemisches von Zellen oder einer einzelnen Zelllinie Fremd-Gene freisetzen und damit
30 die Transkription und Expression von Fremd-Nukleinsäure und/oder Fremd-Protein in den einzelnen Zellen des Gemisches oder in der Zelllinie bewirken.
5. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 4, **dadurch geeignet**
35 **ist**, daß die durch die bakterielle Infektion in den Wirts-

- 47 -

organismus eingeführte Fremd-DNA dort die Bildung eines dem Wirtsorganismus fehlenden oder fremden Proteins veranlaßt oder durch die Bildung von einzel- oder doppelsträngiger Nukleinsäure die Bildung eines Proteins oder die Wirkung einer Nukleinsäure im Wirtsorganismus erhöht, vermindert oder verhindert.

6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die durch die bakterielle Infektion in den Wirtsorganismus eingeführte Fremd-DNA

- a) zur somatischen Gentherapie oder
- b) zum immunologischen Schutz vor mikrobiellen Erregern oder
- c) zum immunologischen Schutz vor Tumorerkrankungen

eingesetzt und prophylaktisch oder therapeutisch wirkt.

7. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß Bakterien der Gattungen Aeromonas, Bartonella, Brucella, Campylobacter, Clostridia, Enterobacteriaceae, Legionella, Listeria, Mycobacterium, Renibacterium, Rhodococcus oder Bakterien aus mit ihnen genetisch oder biochemisch verwandten Gattungen eingesetzt werden, die im eukaryonten Wirtsorganismus intrazellulär lebensfähig sind.

8. Verfahren gemäß Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Bakterien durch Auswahl und genetische Manipulation endogener bakterieller Pathogenität-assoziiierter Gene, vorzugsweise in ihrer in vivo-Pathogenität derart abgeschwächt oder gestärkt werden, daß die Bakterien

- a) in definierte Organe des Gesamtorganismus,

- 48 -

b) in bestimmte Gewebe des Wirtsorganismus oder

c) in bestimmte Kompartimente von Zellen

5 vordringen und dort die Fremd-DNA freisetzen.

9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den manipulierten Bakterien um Listerien handelt.

10 10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den manipulierten Bakterien um Listerien mit den Hinterlegungsnummern DSM 11 881 und DSM 11 882 handelt.

11. Verfahren gemäß den Ansprüchen 9 und 10, dadurch
15 gekennzeichnet, daß in den Bakterien die Gene der im Sequenzprotokoll genannten SEQ ID Nr. 1 und SEQ ID Nr. 2 oder Gene, die mit ihnen mindestens in 35% der Nukleotidpositionen übereinstimmen, genetisch mutiert, deletiert oder blockiert sind.

20 12. Bakterienstamm für das TGC-Verfahren zur Induktion einer zielgerichteten, somatischen Transgenität, dadurch gekennzeichnet, daß in ihm die im Vektor integrierte und zur späteren Transkription und Expression vorbereitete Fremd-DNA
25 unter der Kontrolle regulatorischer Elemente steht, die aus dem zu infizierenden Zielorgan stammen oder auf dieses Zielorgan ausgerichtet sind.

13. Bakterienstamm nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet,
30 daß er zu einem Sicherheitsstamm mutiert worden ist, indem er durch eine Mutation in einem Gen sein Wachstum nicht mehr an die Umweltbedingungen anpassen kann (cspl Mutante DSM 11 883) und/oder durch eine auxotrophe Mutation entsprechend SEQ ID No. 1 und/oder durch eine Mutation im Sinne der endogenen
35 Attenuation (Stämme DSM 11 881 und 11 882) und/oder durch die

zusätzliche Ausstattung mit einem exogenen Suizidgen genetisch verändert wird.

14. Bakterienstamm nach Anspruch 13, **dadurch gekennzeichnet**,
5 daß er zu einem Sicherheitsstamm mutiert ist, in dem

a) das cspl-Gen gemäß Sequenzprotokoll SEQ ID No. 2
oder ein mit ihm in mindestens 35% der Nukleotidpo-
sitionen übereinstimmendes Gen mutiert oder blok-
10 kiert ist oder

b) das cspl-Gen deletiert ist (Stamm DSM 11883),

c) das dapE-Gen gemäß Sequenzprotokoll SEQ ID No. 1
15 oder ein mit ihm in mindestens 35% der Nukleotidpo-
sitionen übereinstimmendes Gen deletiert oder
blockiert ist oder

d) das actA-Gen und/oder das plcB-Gen und/oder das
20 hly-Gen oder andere an der Virulenz beteiligte Gene
mutiert, deletiert oder blockiert sind.

15. Verfahren nach Anspruch 8, **dadurch gekennzeichnet**, daß
es sich bei den manipulierten Bakterien um Salmonellen
25 handelt, insbesondere um Salmonellen des Stammes mit der
Hinterlegungsnummer ATCC14028 oder um Abkömmlinge dieses
Stammes die gemäß dem Anspruch 14 genetisch verändert sind,
handelt.

30 16. Verfahren gemäß Anspruch 15, **dadurch gekennzeichnet**, daß
die Bakterien durch eine Mutation im aroA-Gen, hinterlegt in
der Genbank Sequenz M 10947, auxotroph sind.

17. Verfahren gemäß Anspruch 8, **dadurch gekennzeichnet**, daß
35 es sich bei den genetisch manipulierten Bakterien um apathoge-

ne Listerien, um apathogene oder fakultativ pathogene Enterobacteriaceae oder andere apathogene Bakterien handelt.

18. Verfahren zur Transfektion von animalen Zellen durch
5 Fremd-DNA, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Bakterien als Träger der Fremd-DNA im Cytoplasma

- 10 a) wegen einer auxotrophen Mutation nicht lebensfähig sind;
- b) wegen eines fremden Suizidgens nicht lebensfähig sind;
- 15 c) in die Endosomen der Zellen eindringen, dieses Kompartiment aber nicht verlassen können und dort lysiert werden;
- d) in Phagolysosomen aufgenommen werden, diese Kompartimente lysieren und ins Cytoplasma eindringen;
20 und
- e) durch Behandlung mit Antibiotika zerstört werden

und dadurch die Fremd-DNA freisetzen.

25 19. Verfahren zur Herstellung eines vorbestimmten Fremd-Proteins, **dadurch gekennzeichnet**, daß eine ausgewählte Zelle, ein ausgewähltes Gewebe oder ein Organ gezielt bakteriell infiziert und dort die Bildung des vorbestimmten Proteins
30 initiiert wird und anschließend das Fremd-Protein aus der Zelle, dem Gewebe oder dem Organ isoliert und gereinigt wird.

20. Verfahren nach Anspruch 20, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Expression von Fremd-Protein im Euter von Milch produzie-
35 renden Tieren oder in Eiern von Geflügeltieren oder im Blut

oder anderen Geweben von Nutztieren durch Infektion mit Bakterien induziert wird.

21. Transgenes Nutztier, **dadurch gekennzeichnet**, daß alle
5 Zellen seines Organismus oder die Zellen eines oder mehrerer
seiner Gewebe oder Organe durch Anwendung des Verfahrens nach
Anspruch 1 genetisch verändert sind.
22. Verfahren zur Induktion einer somatischen Transgenität
10 gemäß Anspruch 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß das somatisch
transgene Gewebe einem Gesamtorganismus reimplantiert und der
lebende Gesamtorganismus auf diese Weise somatisch transgen
wird.

SEQUENZPROTOKOLL

5 ALLGEMEINE ANGABEN

10 ANMELDER: 1. Privatdozent
Dr. Christoph von Eichel-Streiber
Bingerweg 15
55444 Schweppenhäusen
15 Bundesrepublik Deutschland
Tel.: 06724/33 98
Fax : 06724/33 98

20 2. Prof. Dr. Trinad Chakraborty
Seltersweg 85
35390 Gießen
Bundesrepublik Deutschland
Tel.: 0641/76 536
Fax : 0641/99 41 259

25 BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG:

30 TGC-Verfahren zur Induktion einer zielgerichteten,
somatischen Transgenität

ANZAHL DER SEQUENZEN: 2

35 ZUSTELLANSCHRIFT : Patentanwälte
Dr. Rainer A. Keil
Ludwig R. Schaafhausen
Nanno M. Lenz
Dr. K.-H. Meyer-Dulheuer
Eysseneckstraße 31
D-60322 Frankfurt am Main

COMPUTERLESBARE FASSUNG

DATENTRÄGER : Diskette
 COMPUTER : IBM PC compatible
 5 OPERATING SYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
 SOFTWARE : Word Perfect 6.0

Angaben zur Sequenz ID-No 1:

10 Länge : 1260 Basenpaare
 Art : Nukleinsäure und davon abgeleitete
 Aminosäuresequenzen
 Strangform : Einzelstrang
 Topologie : linear
 15 Herkunft : *Listeria monocytogenes* Stamm EGD
 Serotyp 1/2a
 Merkmal : Sequenz des *dapE* Gens, das eines der
 für die Synthese der Diaminopimelin-
 säure notwendigen Schlüsselenzyme
 20 ist. Die Aminosäure sequenz ist hoch
 homolog zu N-succinyl-L-diaminopime-
 lic acid desuccinylase (*dapE*) unter
 anderem aus *Escherichia coli*, *Bacil-*
lus subtilis, *Lactobacillus* spp.,
 25 *Mycobacterium tuberculosis*.

Aminosäuresequenz: 318 Aminosäuren
 Nukleotidsequenz : 1260 Nukleotide

30

```

1  TGCCTTTATA GAGAACGGGA AAACATAGAG TGGAATTCAT AGAAAGAGGG
51  CGTGAAATAT GGACCAACAA AAAAAGATTC AAATTTTAAA GGAATTGGTA
101 AATATTGATT CGACTAATGG GCATGAAGAA CAAGTTGCGA ACTATTGCA
151 AAAGTTGTGA GCTGAACATG GTATTGAGTC CGAAAAGGTA CAATACGACC

```

3/5

1201 AACTTTAACT TTACTTATTT CCCGATATAA AATAAGTAAT TAATAGAAGT
 1251 CTAGTATTTG 1260

5 Angaben zur Sequenz ID-No 2:

Länge : 1337 Basenpaare
 Art : Nukleinsäure und davon abgeleitete
 Aminosäuresequenzen
 10 Strangform : Einzelstrang
 Topologie : linear
 Herkunft : *Listeria monocytogenes* Stamm EGD
 1/2a
 Merkmal : Sequenz des "cold shock proteins"
 15 cspL; dieses Protein ist für die
 Lebensfähigkeit der *Listerien* bei
 niedrigen Temperaturen essentiell.

Aminosäuresequenz: 66 Aminosäuren
 20 Nukleotidsequenz : 1337 Nukleotide

1 GAGGCAAGTG GACTAATCAT AAAGTTTTTG GCGATGCAAC TGCGATTTTG
 51 GCAGGAGATG CTTTACTAAC GCTCGCTTTT TCTATTTTAG CTGAAGACGA
 25 101 TAATTTATCT TTTGAGACAC GCATTGCTTT GATTAACCAA ATTAGTTTTA
 151 GTAGCGGTGC AGAAGGAATG GTTGGTGGTC AACTGCGAGA CTTGGAAGCG
 201 GAAAACAAAC AAGTGACGCT AGAAGAGTTA TCATCCATTC ATGCACGAAA
 251 AACGGGTGAA TTATTAATTT ATGCTGTAAC CTCTGCAGCA AAAATTGCGG
 301 AAGCTGATCC AGAACAAACG AAACGCTTAC GAATTTTTCG AGAGAATATT
 30 351 GGGATTGGAT TTCAAATTAG CGACGATATT TTAGATGTAA TTGGTGATGA
 401 AACGAAAATG GGTAAAAAGA CAGGGGCCGA CGCTTTTCTG AATAAAAGTA
 451 CCTATCCCGG ATTACTCACG CTTGATGGGG CAAAAGGGC ATTAAATGAG
 501 CATGTTACGA TTGCAAAGTC AGCGCTTCA GGGCATGATT TCGATGATGA
 551 AATTCTCTTG AAACCTGCTG ATTTAATCGC ACTTAGAGAA AATTAATCAT
 35 601 AATTATCTAG TAATTTCAAA ATTTTTCAC ATATATAATT CAAATTGATT
 651 TGCTTTTCCT AAAATACCGT GTTATACTAA TGTAAGATTA TTTTGTGGG
 701 TGAAAGATAC GATTGTGAAC AACTTCCAT CTCGTGCCGT TAAGCAAGAA

751 TAGTAAATAA TTAGTGTGCA TAACACACGA GGAGGAACAT GAAC ATG GAA
M E
801 CAA GGT ACA GTA AAA TGG TTT AAC GCA GAA AAA GGA TTT GGT TTT ATC GA
Q G T V K W F N A E K G F G F I E
5 851 A CGC GAA AAC GGT GAC GAT GTA TTC GTA CAT TTC AGC GCT ATC CAA GGC G
R E N G D D V F V H F S A I Q G
901 AC GGA TTC AAA TCT TTA GAC GAA GGT CAA GCA GTA ACT TTC GAC GTT GAA
D G F K S L D E G Q A V T F D V E
951 GAA GGC CAA CGC GGA CCT CAA GCA GCT AAC GTT CAA AAA GCG TAA TTC TA
10 E G Q R G P Q A A N V Q K A STOP

1001 TTTTTTGAAT AAGAAAAAGC AAATCATTTT GGTGATTGTC TTTTTTATTT
1051 GTCTAAAATT ATTTTACCTT GTTTGGTTTA ATGGCGATTG TTGCTATAAA
1101 TAAGAACAAT TAATCGAGAA AAAAGACCTT GCACGCATTC ATGCGAGTGG
15 1151 CTCTTTGGAA AGTGAGTTGT TTTTATTGG ATCTTTTAAA GATAAAGGAT
1201 CCTTCCTTTA TGAAGCGATT GGATATACAA GAATTAGAAG CACTTGCAGC
1251 GGATATTCGC GCTTTTTTAA TTAATTCTAC ATCTAAATCA GGTGGGCATA
1301 TTGGTCCGAA TCTTGGTGTG GTAGAACTAA CGATTGTC

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<p>(51) Internationale Patentklassifikation 6 : C12N 15/87, 15/85, C07K 14/195, C12N 1/21, C12R 1/01, A01K 67/027, A61K 48/00</p>	<p>A3</p>	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/29884</p> <p>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 17. Juni 1999 (17.06.99)</p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/08096</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 11. Dezember 1998 (11.12.98)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: 197 54 938.1 11. Dezember 1997 (11.12.97) DE</p> <p>(71)(72) Anmelder und Erfinder: VON EICHEL-STREIBER, Christoph [DE/DE]; Bingerweg 15, D-55444 Schwenningen (DE). CHAKRABORTY, Trinad [SG/DE]; Seltersweg 85, D-35390 Giessen (DE).</p> <p>(74) Anwalt: KEIL & SCHAAFHAUSEN; Cronstetten Strasse 66, D-60322 Frankfurt am Main (DE).</p>	<p>(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i></p> <p>(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: 12. August 1999 (12.08.99)</p>	
<p>(54) Title: TGC METHOD FOR INDUCTING TARGETED SOMATIC TRANSGENESIS</p> <p>(54) Bezeichnung: TGC-VERFAHREN ZUR INDUKTION EINER ZIELGERICHTETEN, SOMATISCHEN TRANSGENITÄT</p> <p>(57) Abstract</p> <p>Disclosed is a TGC method for inducing targeted somatic transgenesis in an animal host, whereby bacteria with a foreign DNA integrated into an episomal vector release, under the control of eukaryotic regulatory elements for ulterior transcription and expression, said foreign DNA in the case of infection of a foreign organism, organ, tissue, cell line or individual cells, causing transcription and expression of foreign DNA and/or foreign protein in said location.</p> <p>(57) Zusammenfassung</p> <p>Es wird ein TGC-Verfahren zur Induktion einer zielgerichteten somatischen Transgenität in einem animalen Wirt beschrieben, bei dem Bakterien mit einer in einen episomalen Vektor integrierten und unter der Kontrolle eukaryonten, regulatorischer Elemente zur späteren Transkription und Expression stehender Fremd-DNA bei der Infektion eines fremden Organismus, eines Organs, eines Gewebes einer Zelllinie oder einzelner Zellen die Fremd-DNA freisetzen und damit dort die Transkription und Expression von Fremd-DNA und/oder Fremd-Protein bewirken.</p>		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauritanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 C12N15/87 C12N15/85 C07K14/195 C12N1/21 C12R1/01 A01K67/027 A61K48/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 C12N C07K C12R A01K A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FR 2 743 086 A (PASTEUR INSTITUT) 4 July 1997	1-8,12
Y	see the whole document	15,16
X	COURVALIN P ET AL: "GENE TRANSFER FROM BACTERIA TO MAMMALIAN CELLS" COMPTES RENDUS DES SEANCES DE L'ACADEMIE DES SCIENCES SERIE III: SCIENCES DE LA VIE, vol. 318, no. 12, 1 December 1995, pages 1207-1212, XP000579701	1-8,12
Y	See example with Plasmid pAT497 see figures 1-3	15,16
--- -/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>*E* earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>*L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>*Z* document member of the same patent family</p> </div> </div>		
Date of the actual completion of the international search <div style="text-align: center; font-weight: bold;">3 June 1999</div>		Date of mailing of the international search report <div style="text-align: center; font-weight: bold;">16/06/1999</div>
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl. Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer <div style="text-align: center; font-weight: bold;">Hornig, H</div>

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	G. DIETRICH ET AL.: "Delivery of antigen-encoding plasmid DNA into the cytosol of macrophages by attenuated suicide <i>Listeria monocytogenes</i> " NATURE BIOTECHNOLOGY, vol. 16, no. 1, January 1998, pages 181-185, XP002104785 NATURE PUBL. CO., NEW YORK, US see the whole document	1-10, 12-14, 17,18
P,X	C.A. GUZMÁN ET AL.: "Attenuated <i>Listeria monocytogenes</i> carrier strains can deliver an HIV-1 gp120 T helper epitope to MHC class II-restricted human CD4+ T cells" EUROPEAN J. IMMUNOLOGY, vol. 28, June 1998, pages 1807-1814, XP002104786 VCH VERLAGSGESELLSCHAFT MBH, WEINHEIM, BRD see the whole document	1-14,17, 18
P,X	C. GRILLOT-COURVALIN ET AL.: "Functional gene transfer from intracellular bacteria to mammalian cells" NATURE BIOTECHNOLOGY, vol. 16, no. 9, September 1998, pages 862-866, XP002104787 NATURE PUBL. CO., NEW YORK, US see the whole document	1-8,12
P,A	D. RAFFELSBauer ET AL.: "The gene cluster <i>inlC2DE</i> of <i>Listeria monocytogenes</i> contains additional new internalin genes and is important for virulence in mice" MOLECULAR & GENERAL GENETICS, vol. 260, no. 2,3, November 1998, pages 144-158, XP002104788 SPRINGER INTERNATIONAL, AMSTERDAM, NL see the whole document	11,14

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family members		Publication date
FR 2743086	A	04-07-1997	NONE		
WO 9708955	A	13-03-1997	US	5824538 A	20-10-1998
			AU	7105996 A	27-03-1997
			CA	2231332 A	13-03-1997
			EP	0881884 A	09-12-1998
WO 9640238	A	19-12-1996	AU	6385196 A	30-12-1996
			CA	2224075 A	19-12-1996
			CN	1192694 A	09-09-1998
			EP	0833660 A	08-04-1998
WO 9315212	A	05-08-1993	FR	2686896 A	06-08-1993
WO 9844131	A	08-10-1998	AU	6868198 A	22-10-1998
WO 9848026	A	29-10-1998	AU	5756298 A	13-11-1998

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 98/08096

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Observation: Although Claim(s) 1-11, 15-20, 22 relate(s) to a method for treatment of the human/animal body, the search was carried out and was based on the cited effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 98/08096

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 97 08955 A (US ARMY ;BRANSTROM ARTHUR A (US); SIZEMORE DONATA R (US); SADOFF J) 13 March 1997	1-10,12, 17,18, 20,21
Y	see page 26, line 19 - line 30 see page 36, line 24 - page 38, line 12; claims 1-44	1-10,15, 16
Y	----- PASCUAL D W ET AL: "ORAL BACTERIAL VACCINE VECTORS FOR THE DELIVERY OF SUBUNIT AND NUCLEIC ACID VACCINES TO THE ORGANIZED LYMPHOID TISSUE OF THE INTESTINE" BEHRING INSTITUTE: MITTEILUNGEN, vol. 98, February 1997, pages 143-152, XP002910650 see page 148, left-hand column, line 20 - line 25	1-10,15, 16
A	----- WO 96 40238 A (UNIV YALE) 19 December 1996 see the whole document	1-22
A	----- WO 93 15212 A (PASTEUR INSTITUT) 5 August 1993 see the whole document	1-22
A	----- T. CHAKRABORTY AND J. WEHLAND: "The host cell infected with Listeria monocytogenes in" HOST RESPONSE TO INTRACELLULAR PATHOGENS, ED. S.H.E. KAUFMANN R.G. LANDES CO.,1997, pages 271-290, XP002104783 Austin, US cited in the application see the whole document	1-22
A	----- S. DRAMSI ET AL.: "Identification of four new members of the internalin multigen family of Listeria monocytogenes EGD" INFECTION AND IMMUNITY, vol. 65, no. 5, May 1997, pages 1615-1625, XP002104784 ASM, WASHINGTON, DC, US see the whole document	1-22
P,X	----- WO 98 44131 A (SIZEMORE DONATA R ;GROVE JASON C (US); SADOFF JERALD C (US); WALTE) 8 October 1998 see the whole document	1-8,12, 18
P,X	----- WO 98 48026 A (BIOTECHNOLOG FORSCHUNG GMBH ;GUZMAN CARLOS (DE); DARJI AYUB (DE);) 29 October 1998 see the whole document	1-8, 12-16,18

-/--

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

REC'D 23 MARS 2000

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

PCT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)



Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts E 52 P 2 WO	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsbericht (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP98/08096	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 11/12/1998	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 11/12/1997
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C12N15/87		
Anmelder VON EICHEL-STREIBER, Christoph et al.		

- Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationale vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
- Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 10 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.
 - ☐ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

Diese Anlagen umfassen insgesamt Blätter.

- Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☒ Priorität
- III ☒ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderische Tätigkeit und der gewerbliche Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☒ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☒ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☒ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 02/06/1999	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 20.03.00
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter Armandola. E Tel. Nr. +49 89 2399 7493 

I. Grundlage des Berichts

1. Dieser Bericht wurde erstellt auf der Grundlage (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten.*):

Beschreibung, Seiten:

1-45 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

1-4,6-13,15,16, ursprüngliche Fassung
19-21

2. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung, Seiten:
☒ Ansprüche, Nr.: 5, 14, 17, 18, 22
☐ Zeichnungen, Blatt:

3. ☒ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)):

siehe Beiblatt

4. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

siehe Beiblatt

II. Priorität

1. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung der beanspruchten Priorität erstellt worden, da folgende angeforderte Unterlagen nicht innerhalb der vorgeschriebenen Frist eingereicht wurden:

- ☐ Abschrift der früheren Anmeldung, deren Priorität beansprucht worden ist.
☐ Übersetzung der früheren Anmeldung, deren Priorität beansprucht worden ist.

2. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung der beanspruchten Priorität erstellt worden, da sich der Prioritätsanspruch als ungültig herausgestellt hat.

Für die Zwecke dieses Berichts gilt daher das obengenannte internationale Anmeldedatum als das maßgebliche Datum.

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP98/08096

3. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

siehe Beiblatt

III. Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit

Folgende Teile der Anmeldung wurden nicht daraufhin geprüft, ob die beanspruchte Erfindung als neu, auf erfinderischer Tätigkeit beruhend (nicht offensichtlich) und gewerblich anwendbar anzusehen ist:

- ☐ die gesamte internationale Anmeldung.
- ☒ Ansprüche Nr. 1-3, 5-11, 15, 16, 19, 20 (IA).

Begründung:

- ☒ Die gesamte internationale Anmeldung, bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. 1-3, 5-11, 15, 16, 19, 20 beziehen sich auf den nachstehenden Gegenstand, für den keine internationale vorläufige Prüfung durchgeführt werden braucht (*genaue Angaben*):
siehe Beiblatt
- ☐ Die Beschreibung, die Ansprüche oder die Zeichnungen (*machen Sie hierzu nachstehend genaue Angaben*) oder die obengenannten Ansprüche Nr. sind so unklar, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte (*genaue Angaben*):
- ☐ Die Ansprüche bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. sind so unzureichend durch die Beschreibung gestützt, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte.
- ☐ Für die obengenannten Ansprüche Nr. wurde kein internationaler Recherchenbericht erstellt.

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	9-11, 13, 15, 16, 19, 20
	Nein: Ansprüche	1-3, 5-8, 12, 21
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	9-11, 13, 15, 16, 19, 20
	Nein: Ansprüche	1-3, 5-10, 12, 21
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	1-3, 4-11, 15, 16, 19, 20
	Nein: Ansprüche	

2. Unterlagen und Erklärungen

siehe Beiblatt

VI. Bestimmte angeführte Unterlagen

1. Bestimmte veröffentlichte Unterlagen (Regel 70.10)

und / oder

2. Nicht-schriftliche Offenbarungen (Regel 70.9)

siehe Beiblatt

VII. Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung

Es wurde festgestellt, daß die internationale Anmeldung nach Form oder Inhalt folgende Mängel aufweist:

siehe Beiblatt

VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:

siehe Beiblatt

Zu Punkt I

Grundlage des Berichts

Die nach Artikel 19(1) PCT beim Internationalen Büro eingereichten Änderungen bringen Sachverhalte ein, die im Widerspruch zu Artikel 19(2) PCT über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgehen. Es handelt sich dabei um, mit dem Telefax von 12. Januar 2000 beantragt, folgende Änderungen:

Die Ansprüche die auf ein Verfahren gerichtet waren, wurden auf ein Produkt (Mittel) gerichtet, das angesichts des Wortlautes 'enthält' neben den Bakterien auch noch andere Bestandteile enthalten kann. Dies ist ursprünglich nicht offenbart. Falls die Anmeldung in der regionalen Phase weiterverfolgt wird, wäre ein Mittel-Anspruch mit 'bestehend aus' jedoch akzeptabel.

Von der vorliegenden Änderungen wurden deshalb nur die Streichung von Ansprüchen 5, 14, 17, 18 und 22 berücksichtigt.

Es wird darauf hingewiesen daß ein Disclaimer (siehe ursprünglich Anspruch 7, neu Anspruch 6) wird, in der regionalen Phase beim EPA nur erlaubt um einen Neuheitsmangel des Gegenstandes der Ansprüche, der durch eine Veröffentlichung nur zufällig besteht, beheben.

Zu Punkt II

Priorität

Folgende Dokumente:

G. DIETRICH ET AL.: 'Delivery of antigen-encoding plasmid DNA into the cytosol of macrophages by attenuated suicide *Listeria monocytogenes*' NATURE BIOTECHNOLOGY, Bd. 16, Nr. 1, Januar 1998, Seiten 181-185, XP002104785 NATURE PUBL. CO., NEW YORK, US

C.A. GUZMÁN ET AL.: 'Attenuated *Listeria monocytogenes* carrier strains can deliver an HIV-1 gp120 T helper epitope to MHC class II-restricted human CD4+ T cells' EUROPEAN J. IMMUNOLOGY, Bd. 28, Juni 1998, Seiten 1807-1814, XP002104786 VCH

VERLAGSGESELLSCHAFT MBH, WEINHEIM, BRD

C. GRILLOT-COURVALIN ET AL.: 'Functional gene transfer from intracellular bacteria to mammalian cells' NATURE BIOTECHNOLOGY, Bd. 16, Nr. 9, September 1998, Seiten 862-866, XP002104787 NATURE PUBL. CO., NEW YORK, US

wurden nach dem Prioritätsdatum der vorliegenden Anmeldung veröffentlicht. Sie gehören deshalb nicht zum Stand der Technik, gemäß Regel 64(1)(b) PCT. Sie könnten jedoch für die Neuheit und erfinderische Tätigkeit des Gegenstandes der vorliegenden Patentansprüche erheblich werden, sollte sich herausstellen daß die Priorität der vorliegenden Anmeldung nicht zu Recht beansprucht wurde.

Zu Punkt III

Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit

Gewerbliche Anwendbarkeit (Art. 33(4) PCT)

Die Ansprüche 1-11, 15, 16, 19 und 20 beziehen sich auf einen Gegenstand, der nach Auffassung dieser Behörde unter Regel 67.1 (iv) PCT fällt. Daher wird über die gewerbliche Anwendbarkeit des Gegenstandes dieser Ansprüche kein Gutachten erstellt (Artikel 34 (4) (a) (i) PCT).

Für die Beurteilung der Frage, ob die Gegenstände der vorliegenden Ansprüche 1-11, 15-20 und 22, insofern sie sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen, gewerblich anwendbar sind, gibt es in den PCT-Vertragsstaaten keine einheitlichen Kriterien. Die Patentierbarkeit kann auch von der Formulierung der Ansprüche abhängen. Das EPA beispielsweise erkennt den Gegenstand von Ansprüchen, die auf die medizinische Anwendung einer Verbindung gerichtet sind, nicht als gewerblich anwendbar an; es können jedoch Ansprüche zugelassen werden, die auf eine bekannte Verbindung zur erstmaligen medizinischen Anwendung und die Verwendung einer solchen Verbindung zur Herstellung eines Arzneimittels für eine neue medizinische Anwendung gerichtet sind.

Zu Punkt V

Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

Es wird auf die folgenden Dokumente verwiesen:

D1: FR-A-2 743 086 (PASTEUR INSTITUT) 4. Juli 1997

D2: COURVALIN P ET AL: 'GENE TRANSFER FROM BACTERIA TO MAMMALIAN CELLS' COMPTES RENDUS DES SEANCES DE L'ACADEMIE DES SCIENCES SERIE III: SCIENCES DE LA VIE, Bd. 318, Nr. 12, 1. Dezember 1995, Seiten 1207-1212, XP000579701

D3: WO 97 08955 A (US ARMY ;BRANSTROM ARTHUR A (US); SIZEMORE DONATA R (US); SADOFF J) 13. März 1997

D1 veröffentlicht die Anwendung von genetisch modifizierten E. Coli Zellen als Vehikel zum Gentransport und Gentransfer und zur Expression von Fremdproteinen in eukaryotischen Zellen. Solche Bakterien können für Gentherapie und/oder Impfung angewendet werden. E. Coli Zellen wurden mit Invasionsgenen aus anderen Bakterien (z.B. Listeria oder Yersinia) modifiziert, so daß sie ins Zellzytosol der eukaryotischen Zellen eindringen und freigesetzt werden können; sie sind jedoch wegen einer Diaminopimelinsäure (DAP) auxotrophie (Suizidgen) in eukaryotischen Zellen nicht lebensfähig. Aus den lysierten Bakterien wird Fremd-DNA in die Zellen freigesetzt und exprimiert.

D2 veröffentlicht die Anwendung von Shigella flexneri (dapB Mutante) und E.coli (dapB Mutanten, durch exogene Gene angriffsfähig gemacht) zum Transfer des β -gal Gens in eukaryotische Zellen. Die Möglichkeit, dieses System sowohl für die Therapie von Zystischer Fibrose als auch für den spezifischen Gentransfer in bestimmte Zielzellen zu benutzen durch die Anwendung von Bakterien, die eine Zelltyp- oder Gewebespezifität besitzen, ist erwähnt.

D3 offenbart die Anwendung von attenuierten (DAP auxotrophe) Shigella flexneri zum Gentransport in eukaryotische Zellen, insbesondere epitheliale Zellen, für Gentherapie oder Impfung.

Neuheit (Art. 33(2) PCT)

1. Der Gegenstand der Patentansprüche 1-8 und 12, kann, im Hinblick auf D1 und D2, nicht als neu angesehen werden. Beide Dokumente beschreiben die Anwendung von Bakterien (Enterobacteriaceae: E. coli, Shigella) die ein Fremdgen enthalten, das in einen episomalen Vektor integriert ist (D1: S. 2, Zeilen 22-35; D2, S. 1209, Result and Discussion, erste 8 Zeilen), für die Gentherapie genetischer Defekte oder bei Tumorerkrankungen und zur Impfung (D1: S. 15, Zeile 29 bis S. 16, Zeile 4; D2: S. 1211, linke Spalte, letzte 12 Zeilen). Die Expression des Fremdgens wird durch regulatorische Elemente der eukaryotischen Zellen kontrolliert (D1: S. 3, Zeilen 23-24). Wegen einer Mutation des DAP-Gens sind die Bakterien in eukaryotischen Zellen nicht überlebensfähig (D1: S. 6, Zeile 28; D2: S. 1209, Results and Discussion, linke Spalte, Zeilen 15-17). Die Verwendung verschiedener Mikroorganismen oder deren Gene, um die Zellspezifität der Mikroorganismen in eine bestimmte Richtung zu lenken, ist auch vorgesehen (D1: S. 4, Zeilen 12-27; D2: S. 1211, linke Spalte, letzter Paragraph).

Die Beschreibung weist darauf hin, daß in dem vorliegenden Verfahren Bakterien eingesetzt werden, die ihre natürlichen Eigenschaften besitzen und den vollen pathophysiologischen Infektionszyklus durchmachen können. Dieses Merkmal könnte Neuheit gegenüber D1-D3, worin die verwendeten Bakterien eine eingeschränkte Lebensfähigkeit aufweisen, etablieren. Das Merkmal ist jedoch nicht in den Ansprüchen enthalten.

2. Anspruch 21 betrifft ein transgenes Nutztier in dem alle Zellen seines Organismus genetisch verändert sind.

Laut Anspruch 1 und der Beschreibung, werden die Zielzellen genetisch verändert, wenn die Bakterien, die Fremd-DNA enthalten, lysiert werden und die DNA in die Zellen freigesetzt wird. Damit können die veränderten Zellen oder das transgene Nutztier von Zellen oder transgenen Tieren, die durch andere TGC Verfahren produziert wurden, nicht unterschieden werden.

Alle transgenen Tiere die im Stand der Technik offenbart wurden, können deshalb unter den Schutzbereich des vorliegenden Anspruchs fallen. Damit kann Anspruch 21 nicht als neu betrachtet werden.

Erfinderische Tätigkeit (Art. 33(3) PCT)

1) Ansprüche 9 und 10 erfüllen nicht die Erfordernisse des Artikels 33(3) PCT.

Die Anwendung von Bakterien, insbesondere *E. coli* und *Shigella*, zum Gentransfer in eukaryotischen Zellen war bekannt (D1-D3).

Die mit den vorliegenden Ansprüchen zu lösende Aufgabe kann somit darin gesehen werden, weitere Bakterienstämme, die Fremdgene in eukaryotische Zellen freisetzen können, zur Verfügung zu stellen. Dokument D3, das als nächster Stand der Technik angesehen wird, deutet die Möglichkeit an, *Listeria* zum Transfer von Fremdgenen in eukaryotische Zellen zu verwenden. Für den Fachmann wäre es daher naheliegend, *Listeria* auszuwählen, um die gestellte Aufgabe ohne erfinderisches Zutun zu lösen.

2) Der Gegenstand der Ansprüche 9-11, 13, 15, 16, 19 und 20 kann als neu und erfinderisch angesehen werden. Weder die spezifische Bakterienstämme, die in den Ansprüchen erwähnt sind noch die Isolierung und Reinigung eines bestimmten Proteins aus einem Organ, das mit genetisch veränderten Bakterien infiziert ist (z. B. Euter in Anspruch 20) wurden veröffentlicht oder nahegelegt.

Zu Punkt VI

Bestimmte angeführte Unterlagen

Bestimmte veröffentlichte Unterlagen (Regel 70.10)

Anmelde Nr. Patent Nr.	Veröffentlichungsdatum (Tag/Monat/Jahr)	Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr)	Prioritätsdatum (zu Recht beansprucht) (Tag/Monat/Jahr)
PCT/EP97/06933	29.10.98	11.12.97	18.04.97
PCT/US98/05704	08.10.98	27.03.98	28.03.97

Die obengenannten Dokumente wurden nach dem Prioritätsdatum der vorliegenden Anmeldung veröffentlicht und angemeldet. Sie gehören deshalb nicht zum Stand der Technik gemäß Regel 64(1)(b) PCT. Sie beanspruchen jedoch ein früheres Prioritätsdatum (18.04.97 und 28.03.97) als die vorliegende Anmeldung (11.12.97). Wenn ihre Prioritätsdaten zu Recht beansprucht wurden, werden die obengenannte Dokumente

während der regionalen Prüfungsphase beim EPA, für die Neuheit des Gegenstandes der vorliegenden Patentansprüche, erheblich.

Zu Punkt VII

Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung

Die Formulierung von Anspruch 20 enthält einen Fehler, da der Anspruch von sich selbst abhängt (S. 50, Zeile 33, "20. Verfahren nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß...").

Zu Punkt VIII

Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

i) In Anspruch 15 wurde der Ausdruck "insbesondere" verwendet. Der Ausdruck bewirkt keine Beschränkung des Schutzzumfangs des Anspruchs, d.h. das nach einem solchen Ausdruck stehende Merkmal ist als rein fakultativ zu betrachten, und kann Unklarheit hervorrufen.

ii) Anspruch 21 betrifft ein transgenes Nutztier in dem alle Zellen seines Organismus durch Anwendung des Verfahrens nach Anspruch 1 genetisch verändert sind. Das bedeutet, daß nicht nur die somatischen Zellen des Tieres sondern auch seine Keimzellen genetisch verändert sind. Anspruch 1 betrifft ein Verfahren zur Induktion einer somatischen Transgenität. Der Anspruch ist daher unklar.

iii) Die Beschreibung weist darauf hin, daß sich das TGC Verfahren auch auf Menschen beziehen kann (siehe S. 7, Zeile 22-23; S. 13, Zeile 15). Da sich die Ansprüche nicht deutlich auf ein somatisches TGC Verfahren beschränken (siehe ii) oben), umfaßt die Anmeldung auch Verfahren zur Keimbahntherapie. Um Problemen während der Prüfung in der regional Phase vorzubeugen, wird der Anmelder darauf hingewiesen, daß derartige Verfahren nach dem EPÜ (Art. 53(a)) nicht zulässig sind.

1632

16C1
Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

RECEIVED
FEB 05 200109/581005
TELECENTER 1602500

Applicant's or agent's file reference E 52 P 2 WO	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/EP98/08096	International filing date (day/month/year) 11 December 1998 (11.12.98)	Priority date (day/month/year) 11 December 1997 (11.12.97)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/87, 15/85, C07K 14/195, C12N 1/21, C12R 1/01, A01K 67/027, A61K 48/00		
Applicant VON EICHEL-STREIBER, Christoph		

<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>10</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of _____ sheets.</p>	
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II <input checked="" type="checkbox"/> Priority</p> <p>III <input checked="" type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p>IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</p> <p>VI <input checked="" type="checkbox"/> Certain documents cited</p> <p>VII <input checked="" type="checkbox"/> Certain defects in the international application</p> <p>VIII <input checked="" type="checkbox"/> Certain observations on the international application</p>	

Date of submission of the demand 02 June 1999 (02.06.99)	Date of completion of this report 20 March 2000 (20.03.2000)
Name and mailing address of the IPEA/ Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP98/08096

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of *(Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.)*:

- ☐ the international application as originally filed.
- ☒ the description, pages 1-45, as originally filed,
 pages _____, filed with the demand,
 pages _____, filed with the letter of _____,
 pages _____, filed with the letter of _____.
- ☒ the claims, Nos. 1-4,6-13,15,16,19-21, as originally filed,
 Nos. _____, as amended under Article 19,
 Nos. _____, filed with the demand,
 Nos. _____, filed with the letter of _____,
 Nos. _____, filed with the letter of _____.
- ☐ the drawings, sheets/fig _____, as originally filed,
 sheets/fig _____, filed with the demand,
 sheets/fig _____, filed with the letter of _____,
 sheets/fig _____, filed with the letter of _____.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☒ the claims, Nos. 5,14,17,18,22
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

3. ☒ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

See the supplemental Box

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP98/08096

II. Priority

1. ☐ This report has been established as if no priority had been claimed due to the failure to furnish within the prescribed time limit the requested:

☐ copy of the earlier application whose priority has been claimed.
☐ translation of the earlier application whose priority has been claimed.
2. ☐ This report has been established as if no priority had been claimed due to the fact that the priority claim has been found invalid.

Thus for the purposes of this report, the international filing date indicated above is considered to be the relevant date.

3. Additional observations, if necessary:

See the supplemental box

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP98/08096

III. Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

- ☐ the entire international application.
- ☒ claims Nos. 1-3.5-11.15.16.19.20

because:

- ☒ the said international application, or the said claims Nos. 1-3.5-11.15.16.19.20 relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*):

See the supplemental Box.

- ☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. _____ are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

- ☐ the claims, or said claims Nos. _____ are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed.

- ☐ no international search report has been established for said claims Nos. _____.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP98/08096

VI. Certain documents cited

1. Certain published documents (Rule 70.10)

Application No.
Patent No.

Publication date
(day/month/year)

Filing date
(day/month/year)

Priority date (valid claim)
(day/month/year)

2. Non-written disclosures (Rule 70.9)

Kind of non-written disclosure

Date of non-written disclosure
(day/month/year)

Date of written disclosure
referring to non-written disclosure
(day/month/year)

See the supplemental Box.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP 98/08096

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: I.3 and I.4

The amendments filed with the International Bureau under PCT Article 19(1) introduce substantive matter which goes beyond the disclosure in the international application as filed, in contravention of PCT Article 19(2). The following amendments requested with the telefax of 12 January 2000 are concerned:

The claims that were directed to a method were directed to a product (agent) which, in view of the term 'contains', may contain other ingredients in addition to the bacteria. This was not originally disclosed. If the application is prosecuted in the regional phase, a priority claim including 'consisting of' would be acceptable, however.

Consequently, only the deletion of Claims 5, 14, 17, 18 and 22 from the present application was taken into consideration.

It should be noted that a disclaimer (see the original Claim 7, new Claim 6) is allowed in the regional phase at the EPO only in order to overcome a lack of novelty of the subject matter of the claims which arises purely by chance as the result of a publication.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP 98/08096

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: II.3

The following documents:

G. DIETRICH ET AL.: 'Delivery of antigen-encoding plasmid DNA into the cytosol of macrophages by attenuated suicide *Listeria monocytogenes*', NATURE BIOTECHNOLOGY, Vol. 16, No. 1, January 1998, pages 181 - 185, XP002104785, NATURE PUBL. CO., NEW YORK, US

C. A. GUZMÁN ET AL.: 'Attenuated *Listeria monocytogenes* carrier strains can deliver an HIV-1 gp120 T helper epitope to MHC class II-restricted human CD4+ T cells', EUROPEAN J. IMMUNOLOGY, Vol. 28, June 1998, pages 1807 - 1814, XP002104786, VCH VERLAGSGESELLSCHAFT MBH, WEINHEIM, BRD

C. GRILLOT-COURVALIN ET AL.: 'Functional gene transfer from intracellular bacteria to mammalian cells', NATURE BIOTECHNOLOGY, Vol. 16, No. 9, September 1998, pages 862 - 866, XP002104787, NATURE PUBL. CO., NEW YORK, US

were published after the priority date of the present application. They are therefore not part of the prior art within the meaning of PCT Rule 64.1(b). They could, however, be relevant for the novelty and inventive step of the subjects of the present claims if the priority of the present application was not validly claimed.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP 98/08096

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: III

Industrial applicability (PCT Article 33(4))

Claims 1 - 11, 15, 16, 19 and 20 relate to a subject matter which, in this Authority's opinion, falls under PCT Rule 67.1(iv). Consequently, no report has been established concerning the industrial applicability of the subjects of these claims (PCT Article 34(4)(a)(i)).

Uniform criteria for assessing the industrial applicability of the present Claims 1 - 11, 15 - 20 and 22, in so far as they relate to a method for treating the human or animal body, do not exist in the PCT Contracting States.

Patentability can also depend on the wording of the claims. The EPO, for example, does not recognize industrial applicability of claims to the use of a compound in a medical treatment; it does, however, allow claims to the first use of a known compound in a medical treatment or to the use of such a compound in the manufacture of a drug for a new medical treatment.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP 98/08096

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	9 - 11, 13, 15, 16, 19, 20	YES
	Claims	1 - 3, 5 - 8, 12, 21	NO
Inventive step (IS)	Claims	9 - 11, 13, 15, 16, 19, 20	YES
	Claims	1 - 3, 5 - 10, 12, 21	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1 - 3, 4 - 11, 15, 16, 19, 20	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

Reference is made to the following documents:

D1: FR-A-2 743 086 (PASTEUR INSTITUT) 4 July 1997

D2: COURVALIN P ET AL: 'GENE TRANSFER FROM BACTERIA TO MAMMALIAN CELLS', COMPTES RENDUS DES SEANCES DE L'ACADEMIE DES SCIENCES, SERIE III: SCIENCES DE LA VIE, Vol. 318, No. 12, 1 December 1995, pages 1207 - 1212, XP000579701

D3: WO-A-97/08955 (US ARMY; BRANSTROM ARTHUR A (US); SIZEMORE DONATA R (US); SADOFF J) 13 March 1997

D1 discloses the application of genetically modified *E. coli* cells as a vehicle for gene transport and gene transfer and for the expression of foreign proteins in eukaryotic cells. Said bacteria can be used for gene therapy and/or inoculation. *E. coli* cells were modified with invasion genes from other bacteria (e.g., *Listeria* or *Yersinia*) in such a way that they can penetrate and be released in the cell cytosol of the eukaryotic cells; however, they are not viable in eukaryotic cells because of a diaminopimelic acid (DAP) auxotrophy (suicide gene). Foreign DNA is released from the lysed bacteria into the cells and expressed.

.../...

(Continuation of V.2)

D2 discloses the application of *Shigella flexneri* (dapB mutant) and *E. coli* (dapB mutants, rendered capable of attacking by exogenous genes) for the transfer of the β -gal gene into eukaryotic cells. The possibility of using this system both for the therapy of cystic fibrosis and for specific gene transfer into particular target cells by using bacteria which possess a cell-type or tissue specificity is mentioned.

D3 discloses the application of attenuated (DAP auxotrophic) *Shigella flexneri* for gene transfer in eukaryotic cells, more particularly epithelial cells, for gene therapy or inoculation.

Novelty (PCT Article 33(2))

1. The subjects of Claims 1 - 8 and 12 cannot be regarded as novel, having regard to D1 and D2. Both documents describe the application of bacteria (*Enterobacteriaceae*: *E. coli*, *Shigella*) containing a foreign gene integrated in the episomal vector (D1: page 2, lines 22 - 35; D2, page 1209, Results and Discussion, first 8 lines) for gene therapy of genetic defects or in tumoral diseases and for inoculation (D1: page 15, line 29, to page 16, line 4; D2: page 1211, left-hand column, last 12 lines). The expression of the foreign gene is controlled by regulatory elements of the eukaryotic cells (D1: page 3, lines 23 and 24). Because of a mutation of the DAP gene, the bacteria are not viable in eukaryotic cells (D1: page 6, line 28; D2: page 1209, Results and Discussion, left-hand column, lines 15 - 17). The use of different microorganisms or genes thereof in order to direct the cell specificity of

.../...

(Continuation of V.2)

the microorganisms in a particular direction is also provided (D1: page 4, lines 12 - 27; D2: page 1211, left-hand column, last paragraph).

The description points out that bacteria which possess their natural properties and can go through the entire pathophysiological infection cycle are used in the present method. This feature could establish novelty over D1 - D3, in which the bacteria used have restricted viability. However, the feature is not defined in the claims.

2. Claim 21 relates to a transgenic domestic animal in which all the cells of its body are genetically modified. According to Claim 1 and the description, the target cells are genetically modified when the bacteria containing the foreign DNA are lysed and the DNA is released into the cells. This means that the modified cells or the transgenic domestic animal cannot be distinguished from cells or transgenic animals produced by other TGC methods. All transgenic animals that have been disclosed in the prior art could therefore fall within the scope of protection of the present claim. Consequently, Claim 21 cannot be regarded as novel.

Inventive step (PCT Article 33(3))

1) Claims 9 and 10 do not comply with the requirements of PCT Article 33(3).

The application of bacteria, more particularly *E. coli* and *Shigella*, for gene transfer in eukaryotic cells was known (D1 - D3).

The problem to be solved by the present claims would therefore appear to be to provide further bacterial strains which can release foreign genes into eukaryotic cells.

.../...

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/EP 98/08096

(Continuation of V.2)

Document D3, which is regarded as the closest prior art, hints at the possibility of using *Listeria* to transfer foreign genes into eukaryotic cells. It was therefore obvious to a person skilled in the art to choose *Listeria* in order to solve the problem of interest without exercising inventive skill.

2) The subjects of Claims 9 - 11, 13, 15, 16, 19 and 20 can be regarded as novel and inventive. Neither the specific bacterial strains mentioned in the claims nor the isolation and purification of a particular protein from an organ infected with genetically modified bacteria (e.g., udder in Claim 20) were disclosed or suggested.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/EP 98/08096

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: VI.1

The above-mentioned documents were published and filed after the priority date of the present application . Consequently, they are not part of the prior art within the meaning of PCT Rule 64.1(b) . However, they claim an earlier priority date (18.04.97 and 28.03.97) than the present application (11.12.97) . If their priority was validly claimed, the above-mentioned documents are relevant for the novelty of the subjects of the present claims during the regional examination phase at the EPO.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/EP 98/08096

VII. Certain defects in the international application

The following defects in the form or contents of the international application have been noted:

The wording of Claim 20 contains an error, because the claim depends on itself (page 50, line 33, "20. Method according to Claim 20, characterized in that ...").

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP 98/08096

VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

i) The expression "more particularly" is used in Claim 15. The expression has no limiting effect on the scope of protection of the claim, that is to say, the feature following any such expression is to be regarded as entirely optional and may give rise to a lack of clarity.

ii) Claim 21 relates to a transgenic domestic animal in which all the cells of its body are genetically modified by application of the method according to Claim 1. This means that not only the animal's somatic cells but also its gametes are genetically modified. Claim 1 relates to a method for inducing somatic transgenicity. The claim is therefore unclear.

iii) The description points out that the TGC method may also concern humans (see page 7, lines 22 and 23; page 13, line 15). Since the claims are not clearly restricted to a somatic TGC method (see ii) above), the application also encompasses methods for reproductive tract therapy. To avoid problems during the regional phase, the applicants are advised that such methods are not allowable under the EPC (Article 53(a)).